

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

SÉRUM ANTICARBONNEUX

PAR E. MARCHOUX

Médecin des Colon's

(Travail du laboratoire de M. Roux, à l'Institut Pasteur)

I

IMMUNISATION DES ANIMAUX PRODUCTEURS DE SÉRUM.

Au mois de janvier 1887, dans le premier numéro de ces *Annales*, M. Metchnikoff signalait ce fait que les cultures de bacilles charbonneux, faites dans du sang de moutons vaccinés, avaient perdu leur virulence, au point qu'un centimètre cube de ces cultures était incapable de donner la mort à un lapin. Était-ce que les bactéries avaient été atténées par contact avec le sérum, ou que ce sérum rendait l'animal insensible au charbon?

La découverte des propriétés préventives du sérum des animaux immunisés, par MM. Richet et Héricourt, suivie de celle du pouvoir antitoxique par MM. Behring et Kitasato, permet aujourd'hui d'aborder ce problème. J'ai recherché si l'immunisation des animaux contre des cultures charbonneuses vivantes et très virulentes ne rendait pas leur sérum préventif et curatif. Mais avant d'entrer dans le détail de mes expériences, qu'il me soit ici permis d'exprimer toute ma reconnaissance à M. Roux, qui a bien voulu me guider dans ces recherches.

La vaccination des petits animaux de laboratoire contre la maladie charbonneuse n'est pas très commode. Le cobaye, si

sensible au charbon, est très difficile à immuniser : le lapin lui-même, plus résistant, doit être traité avec beaucoup de ménagements pour ne point succomber pendant les pratiques de la vaccination.

MM. Roux et Chamberland ont, dans ces *Annales*, décrit un procédé qui permet d'arriver très rapidement à faire supporter à des lapins le charbon virulent¹.

Cette méthode, que j'ai tout d'abord employée, nécessite l'emploi d'un premier vaccin très faible ; celui dont je disposais était d'une virulence un peu trop forte ; aussi ai-je renoncé à l'injecter d'emblée dans les veines, pour ne pas perdre trop d'animaux.

Voici, du reste, comment j'ai opéré :

Je me suis servi des vaccins de l'Institut Pasteur employés pour les moutons. Ils étaient cultivés dans du bouillon de veau peptonisé, et utilisés après vingt-quatre heures seulement de séjour à l'étuve à 35°, alors qu'ils contenaient encore peu de spores. J'inoculais aux lapins la dose maxima non mortelle, soit 1/2 c. c. dans la circonstance.

Dès le lendemain, la température s'élevait d'un degré, mais elle ne tardait point à redescendre pour atteindre la normale vers le 5^e jour à peu près. Quelquefois, dans les jours suivants, il se produisait une deuxième poussée de fièvre, mais de moins longue durée.

Le poids baissait à partir du 3^e jour suivant une courbe rapidement déclive qui, au bout de peu de temps, se redressait légèrement et se transformait en une ligne horizontale.

Les animaux présentaient fréquemment de la diarrhée ; mais jamais d'œdème quand ils devaient résister.

Au 12^e jour on donnait une dose double du même virus, qui, de nouveau, faisait monter la température, mais n'avait aucune action sur le poids.

Après une nouvelle période de 12 jours, j'inoculais le 2^e vaccin, 1/4 c. c. d'une culture de 24 heures.

A la suite de cette injection, la température montait encore, mais le poids n'était nullement influencé et, comme il avait en général repris une marche ascendante, il continuait à croître sans arrêt.

1. Tome I^{er}, p. 513.

Au bout d'un intervalle de temps de même durée, l'inoculation du 2^e vaccin était répétée, mais à dose double. Si tout restait dans l'ordre, j'éprouvais les animaux 8 jours après avec quelques gouttes de sang charbonneux injecté sous la peau.

Si l'élévation de la température et la perte de poids n'indiquaient pas une trop forte réaction, l'immunisation était complétée par des inoculations fréquentes de sang charbonneux et de cultures en bouillon âgées de 24 heures. Le charbon virulent qui me servait était une race de bactéridie tuant un lapin de 2 kilogrammes en 24 heures, à la dose de 1/4 c. c. (culture en bouillon de 24 heures).

En opérant de la sorte, les lapins d'une première série d'expériences arrivèrent à supporter des doses quotidiennes de 1 c. c. de ce charbon; ceux d'une deuxième série reçurent, sans en souffrir, tous les cinq jours, des doses progressives atteignant finalement 20 c. c.

Après une période de repos, variable suivant les expériences, on pratiquait une saignée de la carotide ou de la fémorale, et on recueillait de 50 à 70 c. c. de sang suivant le poids du lapin.

Pour faire des expériences en grand, il est beaucoup plus pratique d'immuniser des moutons, qui fournissent beaucoup plus de sang. Ces animaux, vaccinés d'abord suivant la méthode pastorienne, recevaient ensuite sous la peau des doses de charbon virulent de plus en plus fortes. Celles-ci étaient doublées tous les huit jours, et se sont élevées jusqu'à 200, 250 et même 300 c. c. d'une culture très active, injectés en une seule fois.

Avec ces doses véritablement énormes, les animaux présentent de très vives réactions, qui se manifestent par une diminution de poids, et par une élévation de température qui parfois se maintient pendant huit jours. Aussi, pendant le cours de l'expérience, faut-il suivre la marche de la température et du poids, et interrompre les inoculations si les animaux en souffrent trop.

Les inoculations intravéineuses ne sont guère plus sévères que les inoculations sous-cutanées quand on se sert de petites quantités de virus, mais elles deviennent beaucoup plus dangereuses quand on opère avec de fortes doses.

Un lapin qui avait déjà supporté 20 c. c. de charbon sous la

peau trois jours de suite, et qui, après une vive réaction, était revenu à la santé, est mort après l'administration de la même dose dans les veines : température élevée; diarrhée profuse; amaigrissement considérable. Pendant quelques jours, la dé-marche est mal assurée, puis l'animal reste paralysé du train postérieur, couché dans la cage, et poussant fréquemment de petits cris plaintifs. Il est mort le 8^e jour.

A l'autopsie, malgré de nombreuses recherches, on ne trouva pas de bactéries dans les préparations colorées du sang et de la pulpe des divers organes. La rate donna une culture pure de charbon (deux colonies sur un tube de gélose largement ensemencé).

De même un mouton, qui avait reçu à deux reprises 100 c. c. de charbon sous la peau, et qui était rétabli d'une injection de 50 c. c. faite huit jours auparavant dans la veine du jarret, est mort après l'injection dans la jugulaire de 100 c. c. de culture en bouillon.

Le lendemain, la température était de 39°, mais, au lieu de redescendre le 2^e ou le 3^e jour, elle resta stationnaire, puis s'eleva à partir du 4^e pour atteindre 41°,9 le 5^e jour.

L'amaigrissement était extrême. L'animal restait couché dans un coin de l'écurie, la tête appuyée par terre. Quand on le faisait lever, il y parvenait difficilement et marchait péniblement; il boitait de la patte droite de derrière. Le 6^e jour au matin, il mourait. A l'autopsie, la rate présentait le volume normal et n'était pas altérée dans sa structure; tous les autres organes étaient également normaux. La vessie renfermait de l'urine claire.

Des préparations de sang, de pulpes de foie et de rate, ne permirent de constater au microscope la présence d'aucune bactéridie. Cependant des ensemencements faits avec ces mêmes produits donnèrent des cultures de charbon.

Un mouton vacciné à la façon ordinaire est tout à fait réfractaire au charbon inoculé même à dose notable; cependant le sérum qu'il fournit n'a que des propriétés préventives peu marquées, et point du tout de pouvoir curatif. Pour développer celui-ci, il est nécessaire d'amener l'immunité de l'animal à un degré véritablement excessif, jusqu'à ce qu'il supporte des doses

énormes de charbon qu'il faut renouveler de temps en temps.

A quel moment, après l'inoculation, convient-il de faire la saignée pour obtenir un sérum efficace? Les expériences suivantes montrent que c'est au bout de 15 jours à 3 semaines que le pouvoir curatif du sérum est le plus marqué.

Chez un lapin qui avait reçu 12 c. c. de culture charbonneuse, la première prise de sang a été faite 4 jours après la dernière inoculation, la 2^e prise 15 jours après la 1^{re}, la 3^e 30 jours après la 2^e.

J'ai constaté que le sérum recueilli à la 1^{re} saignée protégeait un lapin de 2 kilog. à la dose de 9 c. c.—Le 2^e sérum était actif à la dose de 7 c. c. Deux lapins de 2 kilog. environ ont été protégés par cette dose. —12 c. c. du 3^e n'ont pas empêché deux lapins de prendre le charbon.

D'autre part, j'ai saigné un mouton 6 jours après une inoculation de 100 c. c., toute réaction ayant disparu. L'animal avait reçu à ce moment 450 c. c. de culture charbonneuse.

Le sérum recueilli n'était pas toxique, puisque j'ai pu en donner 14 c. c. à un lapin sans provoquer la moindre fièvre, mais il n'avait pas un très grand pouvoir préventif.

Une saignée antérieure avait révélé une activité préventive de 1/600, c'est-à-dire que 3 c. c. protégeaient un lapin de 2 kilog. 4 c. c. cette fois-ci ont donné à un lapin une survie de 6 jours sur le témoin, mais ne l'ont point empêché de mourir.

Le même mouton, sans avoir été inoculé de nouveau, a été saigné 15 jours plus tard. A ce moment-là, son sérum était actif au 1000^e, c'est-à-dire que 2 c. c. protégeaient un lapin de 2 kilog.

Un mouton, qui avait reçu 1,400 c. c. de culture, me donnait, au 1^{er} octobre 1895, un sérum dont l'activité était de 2,000. Cet animal avait reçu 300 c. c. de charbon virulent sous la peau le 26 août 1895. Sans avoir été inoculé de nouveau, il a été saigné le 30 octobre. Le pouvoir préventif de son sérum avait à ce moment baissé des deux tiers.

En 30 jours, le sérum avait donc beaucoup diminué d'activité.

Dans ces conditions, il y a tout intérêt à recharger fréquemment les animaux producteurs de sérum, et à ne les laisser reposer que 3 semaines ou un mois au maximum avant d'opérer la saignée.

Une fois recueilli, le sérum se conserve très bien avec tout son pouvoir. Un sérum au 1000^e, au bout de deux mois, n'avait pas diminué d'activité.

II

TRAITEMENT PRÉVENTIF.

L'étude du sérum anticharbonneux a été faite en deux étapes, l'une où j'opérais avec le sérum de lapin, l'autre où j'ai employé le sérum de mouton.

Sérum de lapins. — Le charbon employé pour inoculer les animaux d'expérience était un virus de passage qui, à la dose de 1/4 c. c., tuait un lapin de 2 kilogrammes entre 24 et 72 heures. La dose inoculée était invariablement de 1/3 c. c.

Le 17 août 1894, à une première série de 4 lapins, j'ai donné des doses croissantes de sérum préventif, 24 heures avant l'inoculation charbonneuse.

Le n° 1 qui avait reçu 2 c. c. de sérum est mort 24 h. après le témoin.						
— 2	—	4	—	—	60	—
— 3	—	6	—	—	6 jours	—
— 4	—	9	—	—	a résisté.	
— 5, témoin,	est mort en 24 heures.					

Une deuxième série de 4 lapins a reçu 8, 10, 12, et 15 c. c. du même sérum. Tous ont résisté. Le témoin est mort en 26 heures.

Le lapin qui avait fourni le sérum employé dans les deux expériences avait, au moment où je l'ai saigné, subi 12 inoculations de 1 c. c. de charbon virulent.

Plus tard, lorsque les lapins vaccinés, outre ces 12 c. c., eurent reçu pendant 15 jours de suite 1 c. c. par jour de charbon très virulent, la dose protectrice de sérum a été inférieure à 8 c. c.

Trois lapins ont été traités.

Le n° 4 qui avait reçu 5 c. c. de sérum est mort 5 jours après le témoin.						
— 5	—	6	—	a résisté.		
— 6	—	8	—	a résisté.		

Aucun des lapins qui ont résisté n'a présenté de fièvre après l'inoculation charbonneuse, aucun n'a perdu de son poids; mais aucun d'entre eux n'a acquis l'immunité : inoculés 12 jours après la première expérience avec une dose semblable du même charbon, ils sont tous morts.

Ainsi, le sérum des lapins vaccinés acquiert rapidement le pouvoir préventif, puisque, dans cette expérience, celui-ci était manifeste après l'injection de 12 c. c. de culture charbonneuse virulente, faite en 12 fois.

Ces petites doses fréquemment répétées ont été bien supportées par les animaux traités : j'ai cependant renoncé à les continuer, parce que j'ai remarqué que le pouvoir du sérum augmentait davantage, quand on donnait des doses de virus progressivement croissantes. C'est ainsi qu'un lapin, amené graduellement à supporter la dose énorme de 20 c. c. de charbon, m'a donné dans le même temps un sérum plus actif : 5 c. c. ont suffi à préserver un lapin de 2 kilogrammes.

C'est pour la même raison que, dans le traitement des moutons, la méthode des doses croissantes a été adoptée.

Sérum de moutons. — Le premier mouton avait été saigné le 10 janvier, et son sérum, essayé, n'avait aucune propriété préventive. Deux lapins qui en avaient reçu l'un 12 c. c., l'autre 20 c. c., sont morts en même temps que le témoin. Ce mouton a été de nouveau saigné le 28 mai 1895. Il était en traitement depuis le 18 janvier, et avait reçu à ce moment-là environ 200 c. c., de culture. La dernière inoculation avait eu lieu le 18 mai, et avait été de 100 c. c.

Le 29 mai j'ai inoculé trois lapins : le premier avec 2 c. c. du sérum recueilli la veille, le deuxième avec 4 c. c., le troisième avec 8 c. c. du même sérum.

Le lendemain chacun d'eux reçut, en même temps qu'un témoin, 1/3 de c. c. de culture de charbon virulent.

Le témoin est mort en 24 heures ; le lapin n° 1 en 18 jours, avec quelques rares bactéries dans les organes, mais avec une quantité prodigieuse de bacilles au point d'inoculation. Les bâtonnets étaient serrés les uns contre les autres, comme dans une culture, et n'étaient pas entourés de l'œdème caractéristique.

Les lapins 2 et 3 résistèrent.

J'ai répété cette expérience à plusieurs reprises avec des résultats presque identiques : la prévention a toujours été complète à partir de 3 c. c. ; mais plusieurs fois j'ai rencontré des lapins qui ont résisté avec 2 c. c. seulement. La dose de 1 c. c. n'a jamais protégé.

Un deuxième mouton, qui avait reçu 1.050 c. c. de charbon

virulent, a fourni un sérum dont le pouvoir préventif n'était guère supérieur à celui du premier. La dose qui protégeait sûrement était descendue à 2 c. c.; 1 c. c. prévenait quelquefois la maladie charbonneuse.

Enfin, quand le même mouton eut reçu la dose totale de 1,400 c. c. de cultures virulentes, le pouvoir préventif de son sérum atteint 1/2000 c'est-à-dire que 1 c. c. de sérum protégeait un lapin de 2 kilogrammes inoculé avec 1/4 de c. c. de charbon virulent. Telle est l'activité la plus forte que j'aie pu jusqu'ici donner au sérum anticharbonneux. Mais j'espère l'amener plus tard à un degré d'énergie bien plus considérable, car les animaux en traitement réagissent toujours aux inoculations nouvelles. Je crois aussi qu'en se servant, au lieu de moutons, d'animaux plus grands et plus sensibles au charbon, comme l'âne ou le cheval, on obtiendrait encore de meilleurs résultats.

Quoi qu'il en soit, le sérum de mouton, tel qu'il est aujourd'hui, prévient très nettement le charbon; mais aucun des animaux traités par ce sérum n'était vacciné. Tous ont succombé à une inoculation ultérieure de charbon virulent.

Dans les expériences précédentes j'ai fait les inoculations sous la peau du flanc; je donnais le sérum d'un côté et le charbon de l'autre. Il est d'autant plus important de signaler ce mode opératoire, que les expériences ci-dessus ne sont vraies que dans ces conditions. L'inoculation est plus ou moins grave suivant les points du corps où elle est faite, et la préservation exige alors plus ou moins de sérum.

Pour garantir un lapin inoculé sous la peau de l'oreille, il faut deux fois plus de sérum que lorsque l'injection est faite sous la peau du dos. Lorsque le sérum était au 1000^e, il en fallait au moins 5 c. c. pour que la prévention fût efficace: quand il a été au 2000^e, 3 c. c. suffisaient.

Injectées dans le péritoine, les bactéridies se développent toujours si l'animal en expérience n'a pas reçu des doses considérables de sérum: au moins 15 c. c. d'un sérum au 2000^e.

Dans les veines, l'inoculation est tellement grave qu'il faut, pour la prévenir, se servir d'un sérum beaucoup plus actif, ou bien employer des doses encore plus fortes que celles qui ont été données. J'ai injecté dans le tissu cellulaire sous-cutané de 4 à 15 c. c. de sérum au 2000^e sans apporter un obstacle appré-

ciable à la marche de la maladie. Cependant, 20 c. c. ont donné, à un lapin, 3 jours de survie sur le témoin. A l'autopsie, il n'y avait aucun des signes caractéristiques du charbon; il n'a pas fallu faire moins de 10 préparations colorées de sang et de pulpe de rate pour rencontrer une seule bactéridie. Des tubes de gélose ensemencés largement ont donné de rares colonies de charbon.

Le sérum injecté préventivement dans le péritoine n'est pas plus actif que sous la peau, mais l'est autant. Au contraire, il perd beaucoup de son activité quand il est introduit dans les veines. 4, 8, 10 c. c. d'un sérum qui, donné sous la peau, est préventif au 2000^e, n'ont point empêché de mourir des lapins qui avaient reçu sous la peau 1/4 c. c. de charbon virulent. Ils ont succombé cependant avec un retard de plus en plus accentué sur le témoin : depuis 72 heures jusqu'à 8 jours.

J'ai fait sur les cobayes un certain nombre d'expériences qui ne m'ont donné aucun résultat positif.

1, 2, 4 c. c. de sérum au 1000^e sous la peau, 6 c. c. dans le péritoine, n'ont point préservé contre 1/4 de c.c. de charbon virulent.

10 c. c. du même sérum, inoculés dans le péritoine, ont cependant donné à un cobaye 12 jours de survie sur le témoin. On n'avait injecté que 1/10 de c. c. de culture virulente.

Cette dernière expérience semble indiquer que, quelle que soit la sensibilité du cobaye au charbon, il n'est cependant pas impossible de le préserver; mais il est nécessaire d'avoir un sérum plus actif que celui que je possède, car on ne peut songer à inoculer dans le péritoine d'un si petit animal des doses supérieures à 10 c. c.

C'est une étude que je me propose de reprendre plus tard.

III

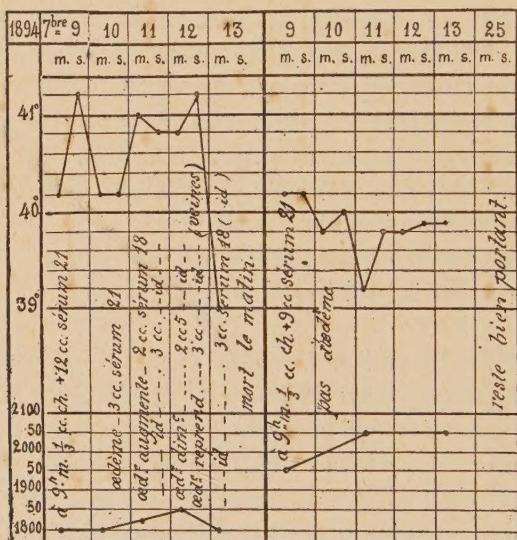
TRAITEMENT CURATIF.

Je comprends sous cette rubrique les cas dans lesquels le traitement a été institué dès le moment de l'inoculation charbonneuse, quoique à proprement parler ce ne soit point là un vrai traitement curatif. Mais chez des animaux qui peuvent succomber au charbon sans avoir présenté, jusqu'aux moments qui précédent

immédiatement la mort, aucun symptôme de maladie, il est bien difficile de déterminer à quel moment commence réellement la cure, à quel moment s'arrête la prévention. D'ailleurs, chaque fois que je parle de simultanéité dans l'application du virus et du sérum, il s'est écoulé en réalité un quart d'heure ou 20 minutes entre l'administration du premier et celle du second.

Les expériences ont été faites en deux séries. La première

DIAGRAMME N° 1.



comprend celles où l'on a employé le sérum de lapin, la deuxième celles faites avec le sérum de mouton.

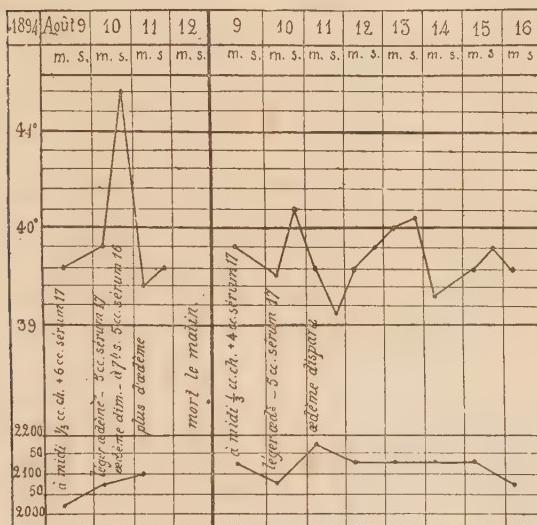
Sérum de lapin. — Sur 24 lapins, traités immédiatement après l'inoculation, 7 sont restés vivants. Ils avaient reçu de 7 à 17 c. c. de sérum, les uns en une seule fois, les autres à doses fractionnées. En général, chez les lapins qui ont survécu, on n'a observé aucun symptôme de maladie ; le plus souvent ceux qui ont eu, malgré l'injection du sérum, de l'œdème et une élévation de température bien accusée, ont succombé, alors même qu'on renouvelait les doses. Mais, dans tous les cas, les lapins traités ont eu une survie sur les témoins. Il va sans dire que la résistance individuelle des animaux entre en ligne de

compte, et qu'une dose de sérum qui suffit à guérir un animal est impuissante à sauver l'autre.

Les expériences représentées par les deux diagrammes 1 et 2 viennent à l'appui de ces diverses propositions.

Le lapin qui a survécu (diagr. 1) n'a pas montré la moindre réaction fébrile ; le charbon introduit sous la peau a été détruit

DIAGRAMME N° 2.



si vite qu'il n'a pas eu le temps d'influencer l'organisme : c'est là presque de la prévention.

Le lapin qui est mort a survécu deux jours au témoin (mort en 57 heures) ; il a eu une réaction fébrile intense. Cependant il avait reçu, même à la première injection, plus de sérum que celui qui a résisté.

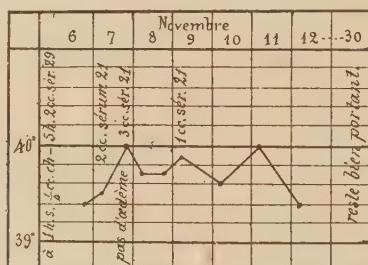
Dans l'expérience du diagr. 2, le témoin est mort en 22 heures.

De même que dans la précédente, le lapin qui a succombé a reçu plus de sérum que celui qui a survécu. Il a eu une réaction très vive ; le second n'a présenté que des symptômes de maladie presque insignifiants : l'œdème, constaté chez lui au lendemain de l'inoculation, était peu accusé et a disparu très vite.

Un lapin, traité 4 heures après l'inoculation charbonneuse, a guéri sans réaction, avec l'injection de 6 c.c. de sérum faite en

trois fois. Son histoire est consignée dans le diagramme ci-dessous. Le témoin est mort en 25 heures.

DIAGRAMME N° 3.



Enfin, dans l'expérience suivante, le traitement n'a été appliqué au lapin n° 2 que 7 heures seulement après l'infection. Il est mort 108 heures après le témoin, malgré les doses nombreuses de sérum qu'il a reçues. Son histoire est cependant intéressante : il a eu, au point d'inoculation, un œdème très accusé qui a fini par disparaître sous l'influence du traitement ; mais, en même temps que l'œdème rétrocédait, la température s'élevait de plus en plus jusqu'à la mort. A l'autopsie, on ne rencontra que quelques rares bactéridies dans les organes, mais les ganglions lymphatiques étaient augmentés de volume et bourrés de bacilles. Le sang et la rate contenaient un nombre prodigieux de cellules éosinophiles.

Le lapin n° 1 avait été traité aussitôt après l'inoculation ; il n'en a pas moins succombé au charbon avec 48 heures de retard sur le témoin qui est mort en 29 heures. (Diagr. 4.)

Aucun des animaux guéris n'était vacciné ; tous sont morts en même temps que le témoin, à la suite de l'inoculation de 1/3 c. c. de charbon.

Ces résultats, fort incomplets, sont dus à ce que le sérum employé n'avait pas un pouvoir suffisant, bien que quelques-uns des lapins qui l'ont fourni pussent supporter, sans réagir, 20 c. c. de culture charbonneuse donnée en une fois.

Sérum de mouton. — Les expériences, avec le sérum de mouton, ont été faites au moyen de sérums d'activité différente, variant de 600 à 2,000 ; c'est-à-dire qu'un centimètre cube, injecté

avant l'infection, suffisait à préserver de 600 grammes à 2 kilogrammes de lapin.

Dans une première expérience, 4 lapins ont reçu des doses de 1, 2, 4, 6 c. c. de sérum, une demi-heure après l'inoculation de $\frac{1}{3}$ c. c. de charbon virulent : ce sérum avait une activité de 600.

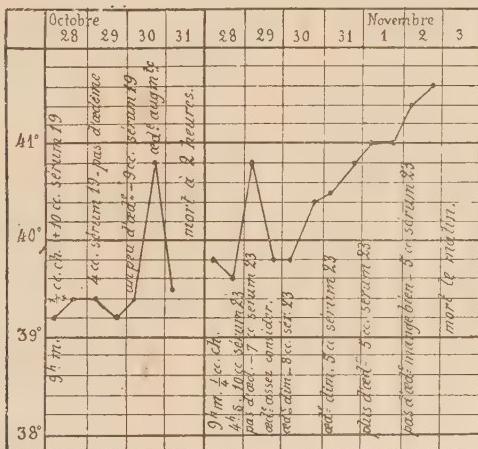
Le lapin témoin est mort en 48 heures.

Celui qui a reçu 1 c. c. est mort en 72 heures.

—	2 c. c.	—	—	144	—
—	4 c. c.	—	—	48	—
—	6 c. c.	—	—	168	—

Dans une deuxième expérience, faite avec le même sérum

DIAGRAMME N° 4.



donné 7 heures après le charbon virulent ($\frac{1}{3}$ c. c.), le lapin n° 1, chez qui la dose de sérum inoculée était de 4 c. c. seulement, est mort 5 jours après le témoin ; le n° 2, qui avait reçu 7 c. c., a survécu après avoir été très malade pendant quelques jours. Une inoculation ultérieure de charbon virulent a montré qu'il était vacciné.

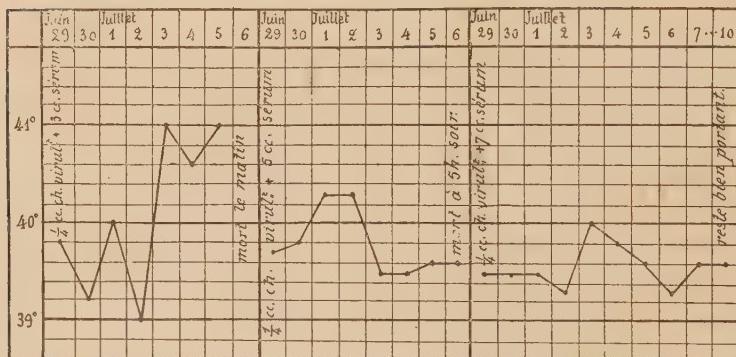
Dans une troisième expérience, le même sérum a été injecté 27 heures après le charbon virulent ($\frac{1}{3}$ c. c.). Les doses inoculées. 2 c. c., 5 c. c. et 14 c. c. n'ont point protégé. Le lapin qui a reçu le plus de sérum est celui qui est mort le plus vite. Le n° 2, qui avait été inoculé le premier jour avec 3 c. c. et le lendemain avec 2 c. c..

est celui qui a survécu le plus longtemps (2 jours de retard sur le témoin).

Lorsque le sérum de mouton a eu une efficacité préventive de 2,000, il est devenu curatif à la dose de 7 c. c. quand il était inoculé en même temps que le charbon, ou bien encore 7 heures après; curatif à la dose de 10 c. c. quand il était injecté 24 heures après le virus, ainsi que le montrent les tableaux suivants :

1^o Injection du sérum et du charbon faite en même temps. Le sérum est introduit sous la peau du flanc gauche, le virus sous la peau du flanc droit. Le témoin, inoculé avec 1/4 c. c.

DIAGRAMME N° 5.



de charbon virulent, meurt en 48 heures; sa température est montée à 41° (Diagr. 5);

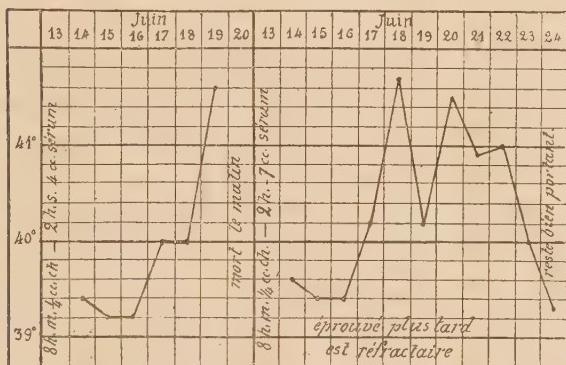
2^o Sérum injecté 7 heures après l'infection. Le témoin meurt en 48 heures (Diag. 6);

3^o Sérum injecté 24 heures après l'infection. Le témoin meurt en 48 heures (Diagr. 7);

Lorsque l'injection d'une dose suffisante de sérum suit de près l'inoculation du virus, les lapins ne présentent aucun signe de maladie, comme si la bactéridie introduite sous la peau ne s'était pas développée. Ces animaux ne sont pas vaccinés : inoculés plus tard, ils meurent du charbon en même temps que les témoins. Il n'en est plus de même lorsque l'intervention est plus tardive. Dans le cas où le sérum a été donné aux lapins 7 heures et 24 heures après l'infection, ceux-ci ont eu de la fièvre, et un commencement de maladie qui s'est arrêté, mais

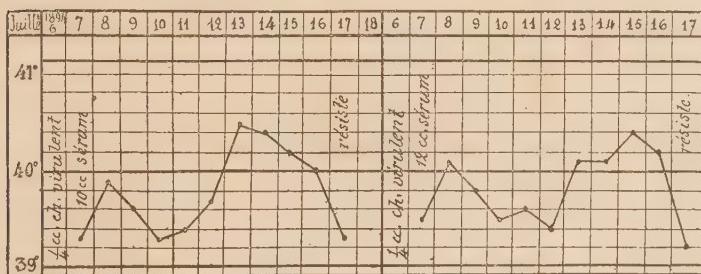
qui a suffi pour leur donner une résistance solide au charbon, car, éprouvés 12 jours après, ils ont à peine réagi à l'inoculation virulente.

DIAGRAMME N° 6.



Lorsque l'œdème est déjà bien développé au moment de l'intervention, la guérison est très difficile, même quand on injecte des doses considérables de sérum, 15, 20 c. c. d'un sérum au 2000^e sous la peau et dans le péritoine. Je n'ai pas sensiblement prolongé l'existence de lapins ainsi tardivement traités. Ils mourraient à peine un jour plus tard que les témoins.

DIAGRAMME N° 7.



Cependant, j'ai pu constater chez quelques-uns, 12 ou 18 heures après l'administration du sérum, soit une diminution notable, soit une disparition complète de l'œdème. Les animaux mou-

raient néanmoins avec de nombreuses bactéridies dans le sang. Mais ce résultat fait espérer que lorsque le sérum aura acquis un pouvoir plus considérable, la guérison sera encore possible à cette période de la maladie.

IV

ACTION DU SÉRUM SUR LES ANIMAUX TRAITÉS.

Comme tous les sérums d'ailleurs, le sérum anticharbonneux n'agit point du tout à la manière d'un vaccin. Son action protectrice s'établit très vite, mais elle cesse de même, comme le prouve l'expérience suivante :

Huit lapins reçoivent la dose minima préventive de sérum (2 c. c.) le 15 août 1895.

Chacun d'eux reçoit ensuite $\frac{1}{4}$ c. c. de charbon virulent, mais après des intervalles de temps différents et chaque fois en même temps qu'un témoin nouveau.

Le 1 ^{er}	est inoculé au moment où il reçoit le sérum : meurt 48 heures après le témoin.
Le 2 ^e	— 6 heures après le premier, résiste.
Le 3 ^e	— 12 — — —
Le 4 ^e	— 24 — — —
Le 5 ^e	— 48 — — —
Le 6 ^e	— 3 jours — — —
Le 7 ^e	— 4 — — Meurt 50 heures après le témoin.
Le 8 ^e	— 5 — — — Meurt en même temps que le témoin.

Si cette action du sérum n'est pas durable, elle est cependant très énergique, puisqu'elle permet à des lapins traités préventivement de détruire le charbon qu'on leur inocule, assez vite pour que l'organisme n'ait pas le temps d'être éprouvé, et pour que les cellules ne soient pas modifiées par les bactéridies introduites. Les animaux, en effet, ne sont jamais vaccinés.

Quel est le mode d'action du sérum ? C'est ce que nous cherchons à élucider par les expériences suivantes :

Quand on injecte 5 c. c. de ce sérum dans le péritoine d'un lapin normal dont l'exsudat péritonéal est clair et transparent, on constate au bout de 24 heures que cet exsudat est d'une richesse inouïe en leucocytes. Il est très dense, blanchâtre, presque laiteux.

Si, à ce moment, on introduit dans ce péritoine un centimètre cube de bouillon dans lequel on a délayé une anse de platine de charbon asporogène cultivé sur gélose, on constate que, 2 minutes

après l'inoculation, l'englobement du charbon par les leucocytes est déjà presque complet ; 10 minutes plus tard on ne rencontre plus de bactéridie libre. Les leucocytes sont réunis en amas au sein desquels on ne voit plus les filaments¹. Si l'on fait des ensements successifs avec cet exsudat péritonéal, on s'aperçoit que le nombre des colonies qui se développent dans les tubes diminue de plus en plus ; au bout d'une heure les colonies deviennent très rares, mais elles sont virulentes. Après 12 heures tous les tubes qu'on sème restent stériles. Les mêmes phénomènes se passent chez le lapin vacciné, mais la phagocytose est moins rapide, à moins qu'on ne l'ait préparé la veille en lui injectant dans le péritoine quelques c. c. de bouillon stérile.

Le sérum semble donc exagérer considérablement l'activité des globules blancs. Il augmente leur mobilité.

En effet, déjà 1/4 d'heure après l'inoculation de charbon virulent à un lapin traité préventivement, on constate, sur des coupes de tissu, que tous les vaisseaux environnant le point d'inoculation sont dilatés et bourrés de leucocytes, dont un grand nombre ont déjà traversé la paroi et se dirigent vers les bactéries. La phagocytose commence immédiatement et s'accélère de plus en plus. Au bout d'une heure toutes les bactéries sont englobées.

On peut suivre ces phénomènes assez facilement en inoculant un animal sous la peau de l'oreille, et en faisant de temps en temps des prises d'exsudat avec une pipette stérilisée.

Dès le premier quart d'heure il se développe au point d'inoculation de la rougeur, et le thermomètre indique dans cette région une élévation de température notable.

L'exsudat, prélevé à ce moment, contient déjà beaucoup de leucocytes qui ont englobé quelques bactéridies. La majeure partie des bâtonnets est libre cependant, mais, au bout d'une demi-heure, la proportion change, les bactéridies libres sont en minorité.

Au bout d'une heure, en général, la phagocytose est complète. Il est facile de s'en convaincre : sur une lame on dépose une gouttelette d'exsudat qu'on étend rapidement en une couche mince qui sèche aussitôt. On fixe à la flamme et on colore à la

1. Dans une série d'expériences faites sur des lapins très bien vaccinés, et sur des lapins auxquels on venait d'injecter, dans le péritoine, du sérum préventif, je n'ai pas observé un changement de forme des bactéridies comparable à celui que M. Pfeiffer a décrit pour le vibron cholérique.

thionine (solution de Nicolle, *Annales de l'Institut Pasteur*, août 1895). En faisant la double coloration à l'éosine alcoolique et au bleu de méthylène à 3 0/0, on peut facilement, comme l'ont vu déjà MM. Metchnikoff pour le choléra, Cantacuzène pour le *vibrio Metchnikovi*, Mesnil dans la lymphé des Lézards inoculés du charbon, constater qu'une partie des bactéridies ne prend plus le bleu et se colore en rouge par l'éosine.

Déjà, une heure après l'inoculation, il y presque autant de microbes rouges que de microbes bleus; quelques-uns d'entre eux paraissent violets parce qu'ils prennent les deux colorations.

On peut quelquefois observer ce phénomène à un stade plus avancé: les bactéridies rouges se segmentent et deviennent des granulations pseudo-éosinophiles.

Pour faire ces différentes recherches, il est nécessaire de se servir de plusieurs lapins, car le seul fait de léser les tissus pour prélever un peu d'exsudat suffit à modifier les résultats. Je l'ai constaté maintes fois. Les lapins auxquels on a fait des prises antérieures gardent plus longtemps des bactéridies libres dans l'exsudat.

Plus on a fait de prises, moins l'animal réagit. Plusieurs lapins dont l'oreille avait été profondément lésée par la pipette ou par des pressions exercées sur la partie œdématisée, ont fini par mourir avec une puullulation des bacilles charbonneux. Ils avaient reçu préventivement 5 c. c. de sérum au 1,000^e.

Ainsi, quand il y a une entrave à l'absorption rapide du bacille charbonneux, l'animal ne résiste pas. J'ai répété souvent avec le même succès l'expérience suivante: A deux lapins je donnais 5 c. c. de sérum, puis, le lendemain, je les inoculais en même temps qu'un témoin; à l'un je donnais 1/4 c. c. de charbon sous la peau de l'oreille; à l'autre j'injectais la même quantité, mais au sein d'une ecchymose que j'avais provoquée en martelant légèrement l'oreille. Le lapin n° 2 présentait déjà dès le lendemain une élévation considérable de la température, qui restait normale chez le n° 1. Il se montrait souvent de l'œdème de l'oreille qui, dans quelques cas mêmes, atteignait des dimensions monstrueuses. Cette élévation de température et cet œdème persistaient pendant les jours suivants, enfin l'animal finissait par mourir avec 5 ou 6 jours de retard sur le témoin. A l'autopsie on trouvait peu de bactéridies, mais on en rencontrait dans tous les organes.

Le lapin n° 1 auquel on n'avait pas fait de lésion résistait.

C'est que, dans cette expérience, faite à l'exemple de celles de MM. Roux et Nocard pour le charbon symptomatique, et de M. Vaillard pour le téton, l'introduction des bacilles dans un caillot a empêché l'intervention des phagocytes pendant la période où agit le sérum. Préservées de la destruction, les bactéries pullulent.

C'est ainsi, sans doute, que les choses se passent quand on inocule du sang charbonneux. En effet, les doses de sérum qui suffisent pour préserver contre 1/4 de c. c. de culture, sont tout à fait impuissantes contre la même quantité de sang charbonneux. Bien plus, 20, 30 c. c. d'un sérum au 2,000^e, n'ont point entravé l'infection causée par le sang. L'animal qui a reçu la première dose a survécu un jour au témoin, celui à qui on a donné la 2^e est mort cinq jours plus tard.

40 c. c. du même sérum ont protégé un lapin qui, après avoir été très malade, s'est remis définitivement. Tous ces animaux avaient reçu environ 1/4 c. c. de sang charbonneux.

Ceux qui sont morts présentaient au point d'inoculation un caillot formé par le sang inoculé.

C'est peut-être cette circonstance qui rend la préservation si difficile, car elle réalise des conditions semblables à celles que présentaient les animaux inoculés dans une ecchymose.

Pour m'en assurer, j'ai essayé de supprimer ce caillot en délayant soigneusement 1/4 c. c. de sang charbonneux dans 5 c. c. de bouillon stérile et en laissant reposer pendant quelque temps. Quand le liquide ne m'a plus paru contenir de grumeaux en suspension, j'ai décanté la partie supérieure en la puisant délicatement avec une seringue armée de son aiguille. Je me suis assuré que cette liqueur, bien reposée, contenait encore beaucoup de bactéries. Deux lapins, qui la veille avaient reçu 8 c. c. de sérum au 2000^e, ont reçu, l'un le sang délayé, l'autre 1/4 c. c. de sang pur, ce dernier en même temps qu'un témoin.

Le lapin n° 1 a survécu après avoir été assez gravement malade ; le n° 2 est mort 4 jours après le témoin.

Les phagocytes étaient donc bien arrêtés par le caillot qui les empêchait d'assurer la protection de l'organisme. En faisant disparaître l'obstacle, on a rendu la prévention possible.

Les spores charbonneuses sont munies d'une membrane d'enveloppe très résistante qui s'oppose à leur destruction rapide par les phagocytes. Aussi je n'ai jamais pu préserver un lapin contre une infection par des spores.

J'ai injecté 5, 10, 12 c. c. de sérum préventif à des lapins qui recevaient ensuite 1/4 c. c. d'un bouillon contenant en suspension un grand nombre de spores charbonneuses recueillies sur de vieilles cultures.

Le n° 1 a eu 4 jours, les deux autres 5 jours de survie sur le témoin.

J'ai pu prolonger pendant 12 jours la vie d'un lapin auquel je donnais tous les deux jours 5 c. c. de sérum pour maintenir son immunité. J'ai dû cesser ces inoculations par manque de sérum : l'animal est mort 4 jours plus tard.

C'est parce que le charbon qui me sert d'ordinaire contient quelques spores (quoique les cultures n'aient pas plus de 24 heures de séjour à l'étuve) que deux des animaux immunisés avec la dose minima préventive sont morts l'un après 18 jours, l'autre après 24 jours, avec une véritable culture au point d'inoculation.

Cet accident ne s'est jamais produit quand je me suis servi de charbon asporogène. La destruction de ces bactéries filamenteuses semble aussi plus commode pour les cellules, car, au moment où le sérum avait un pouvoir de 1/1000, 1 c. c. 5 a suffi pour protéger un lapin qui recevait le lendemain 1/4 c. c. d'une culture en bouillon de charbon asporogène.

De même un autre lapin, grâce à une injection préventive de 3 c. c. seulement du même sérum, a résisté à 1/4 c. c. de charbon asporogène inoculé sous la peau de l'oreille.

Les témoins avaient succombé en 3 et 4 jours.

Je ne sais encore à quelle influence attribuer un phénomène qui se produit souvent avec le sérum anticharbonneux provenant du mouton. Il se forme au point d'inoculation, même avec de très petites doses, un œdème riche en leucocytes polynucléaires qui se résorbe d'ailleurs en 24 heures.

Je n'ai jamais observé cet œdème à la suite des injections de sérum de mouton normal ; M. Marmorek qui, dans ses recherches sur le sérum antistreptococcique, a employé le sérum de mouton, n'a jamais non plus fait cette remarque.

V

DE L'IMMUNITÉ CHEZ LES ANIMAUX VACCINÉS.

L'immunité acquise par la vaccination ne ressemble pas du tout à celle que procure le sérum anticharboneux. Elle est aussi profonde que celle-ci est superficielle, aussi durable que la seconde est fugace.

Des animaux vaccinés ont pu recevoir des doses véritablement formidables de cultures virulentes ; un lapin vacciné depuis un an, qui depuis 8 mois n'avait point reçu de charbon, a supporté d'un seul coup 5 c. c. de culture. Cependant les inoculations antérieures n'avaient jamais dépassé 1 c. c. de culture virulente à la fois.

On peut inoculer, à l'oreille, un lapin vacciné sans provoquer chez lui autre chose qu'un petit abcès si le charbon employé était en flocons.

On peut faire une ecchymose et inoculer dans le caillot du charbon virulent sans amener chez le lapin vacciné une élévation notable de la température. C'est à peine s'il y a un peu de chaleur locale, qui tient à la congestion des vaisseaux au travers desquels se fait la diapédèse. Sans doute, chez cet animal, la toxine a déjà fait son œuvre, les cellules sont aguerries, et les phagocytes n'ont pas besoin de se hâter pour préserver l'organisme. Le travail de destruction des bactéries par les cellules va lentement, mais continuellement ; elles n'ont pas de ces défaillances fatales que l'on observe dans les essais de protection par le sérum.

On peut également donner à un lapin vacciné du sang charbonneux sans provoquer chez lui autre chose qu'une réaction proportionnelle à la dose injectée.

La destruction dans ce cas s'opère plus lentement que lorsqu'on inocule une culture, en bouillon, de charbon non floconneux. Six heures après l'inoculation, il n'y a pas encore de phagocytose appréciable, même quand le sang est déposé sous la peau en couche très mince. Au bout de dix heures, en général, l'englobement est complet.

Dans un cas, 24 heures après l'inoculation, presque tous les leucocytes contenus dans l'exudat renfermaient une ou deux

bactéridies qui se coloraient entièrement par l'éosine. 30 heures après, il n'y avait plus que quelques cellules qui contenaient encore des bâtonnets rouges, la plupart ne renfermaient que des granulations éosinophiles ou plutôt pseudo-éosinophiles, disposées quelquefois suivant une ligne droite qui figurait encore le bâtonnet désagrégé.

Au bout de 36 heures, on ne rencontrait plus qu'un très grand nombre de leucocytes bourrés de granulations éosinophiles. Beaucoup d'entre eux même avaient éclaté ou s'étaient détruits, et de nombreuses granulations paraissaient libres dans la préparation.

Les leucocytes qui détruisent si facilement le sang charbonneux n'ont pas la même activité vis-à-vis du charbon en flocons ou des spores.

Quand on inocule des flocons, la destruction ne peut s'opérer qu'à la périphérie, où les leucocytes s'amassent en quantités énormes. Les premiers arrivés englobent des filaments et les transforment, mais la cellule ne sort pas toujours intacte de cette lutte avec le microbe. Quand on retire un peu d'xsudat pris au milieu du point d'inoculation, on voit des globules blancs dont le protoplasma ne se colore plus du tout, dont le noyau écrasé, étalé, prend un peu l'éosine. Les granulations éosinophiles nombreuses que contenait le leucocyte sont dispersées autour de lui. La cellule est visiblement morte.

Mais, au pourtour, il existe une ceinture de leucocytes nouvellement arrivés ; ils sont arrêtés par la masse centrale qui augmente constamment. Au bout d'un temps plus ou moins long, il s'est formé là un vrai petit abcès, dans lequel on trouve encore des bactéridies vivantes, et qui finit par se résorber quand tous les microbes sont détruits.

C'est le même phénomène qui se passe quand on introduit sous la peau de l'oreille d'un lapin des spores en suspension dans du bouillon. Il se développe encore un abcès, mais la genèse en est différente.

Les spores ne sont pas réunies en masse compacte ; elles sont séparées, aussi ne tardent-elles pas à être englobées.

Les leucocytes qui arrivent se chargent rapidement de ces germes. J'en ai rencontré au bout d'une heure qui contenaient 12 et 14 spores dans leur intérieur.

12 heures après l'inoculation, le phénomène avait un peu changé de nature. Ces leucocytes, bourrés de spores, avaient éclaté; on en voyait les débris, le noyau était en voie de destruction et prenait l'éosine. Mais d'autres leucocytes étaient arrivés, qui avaient fait autour de ces spores comme une barrière et les enfermaient dans une zone extérieure à l'animal, pour ainsi dire, au sein de laquelle elles étaient libres ou englobées.

24 heures après, cet embryon d'abcès s'était affirmé. Il était formé, au centre, de leucocytes détruits en majorité et de quelques autres en bon état et remplis de spores, à la périphérie de phagocytes récemment immigrés.

Les spores, dont la coque est sans doute difficile à entamer par les sécrétions des phagocytes, résistent longtemps. Quelques-unes sont cependant détruites à l'état de spores qui deviennent colorables par l'éosine; mais la majorité disparaît suivant le procédé indiqué par Trapeznikoff dans ces *Annales*¹. Elles germent et deviennent alors de très courts bâtonnets colorables par le bleu de méthylène. Ces jeunes bactéries, rapidement engobées, sont détruites alors par les cellules.

Mais ces transformations se produisent très lentement: 70 jours après l'inoculation, j'ai pu, au sein de l'abcès, recueillir un peu de pus qui m'a donné des cultures pures de charbon et qui a tué un cobaye en 48 heures.

L'abcès est une forme de guérison par localisation de la maladie, et la bactéridie charbonneuse, comme les autres microbes, est capable d'en produire. Si l'on ouvre ces abcès et qu'on évacue le pus formé, comme je l'ai fait chez un lapin, la petite plaie ne tarde pas à se cicatriser et l'animal ne présente aucune trace nouvelle d'infection locale ou générale.

Les éléments cellulaires jouent donc chez les lapins vaccinés contre le charbon un rôle très important. Ce sont les phagocytes qui empêchent la pullulation des bacilles et qui sont chargés de les détruire. J'ai essayé par divers moyens de mettre en défaut cette activité des phagocytes et de permettre à la bactéridie de se développer malgré l'immunité acquise.

J'ai inoculé à un lapin vacciné du charbon une culture de streptocoque de l'érysipèle sous la peau de l'oreille, puis je lui ai donné une culture de charbon contenant des spores. L'animal

1. Tome V, p. 362.

a été très malade ; il a eu un érysipèle typique qui a envahi toute la tête, mais dont il a fini par guérir après avoir présenté des températures très élevées. Le témoin qui avait reçu du strepto-coque a guéri également après une longue maladie. Un lapin témoin, qui avait reçu 1/4 c. c. de la culture charbonneuse, est mort en 48 heures.

J'ai répété la même expérience en inoculant dans les veines les deux virus. Les témoins sont morts, le lapin vacciné a résisté.

J'ai essayé de donner à un autre animal des toxines provenant d'une culture chauffée d'un *B. coli* récemment recueilli dans les matières fécales d'un enfant atteint de diarrhée. Il y a eu une réaction très vive, mais le charbon inoculé en même temps a été détruit néanmoins.

J'ai répété l'expérience sur un 4^e lapin en donnant d'abord la toxine de *B. coli*, et en inoculant le charbon pendant la fièvre. Le succès n'a pas été plus grand.

Un 5^e lapin a reçu 6 c. c. de culture vivante de bacille de Kiel. Il s'est formé un vaste abcès au point d'inoculation, mais le charbon, donné en même temps, n'a pas pullulé.

La macération de la levure de bière développe chez les animaux auxquels on l'injecte une fièvre ardente, mais de courte durée. J'ai essayé d'inoculer du charbon pendant cette période fébrile ; il a été détruit.

J'ai inséré sous la peau d'un lapin des spores charbonneuses enrobées dans de la gélose. Elles sont restées en place sans provoquer de réaction fébrile, et ont formé un nodule d'induration qui a persisté jusqu'à la mort de l'animal, survenue accidentellement sans qu'on puisse trouver dans ses organes aucune trace de charbon.

J'ai donné à un lapin vacciné 1/5 c. c. de toxine diphtérique. Le lendemain, la température étant très élevée, je lui ai inoculé 1 c. c. de charbon contenant des spores. Il est mort le surlendemain. Tous les organes ensemencés n'ont donné aucune culture de charbon.

J'avais renoncé à vaincre cette immunité si tenace, quand sont arrivés les grands froids des mois de janvier et février 1893. Le 28 janvier, je donne 1 c. c. de charbon à un lapin qui avait déjà résisté à des doses répétées de charbon, et qui n'avait point

été inoculé depuis 12 jours. Cet animal, resté exposé au froid vif de la nuit, du lendemain, de la nuit suivante, meurt le 31 janvier à midi. Ses organes contenaient des bactéries et ont donné des cultures pures de charbon.

J'ai, le 5 février, essayé de répéter l'expérience sur un autre animal vacciné qui est, après inoculation, resté exposé dehors pendant deux jours. Le 8 février, il a été tondu en partie. Il est mort le 10. Il y avait des bactéries dans le sang et dans les organes.

Puis les froids ont cessé, je n'ai pas pu continuer.

Je dois signaler pour finir qu'une lapine énergiquement vaccinée, inoculée pendant la gestation avec 1/2 c. c. de charbon, est morte avec des bacilles dans tous les organes.

Ces diverses expériences sont d'une interprétation facile. Dans le premier cas, le froid, comme dans l'expérience si connue de M. Pasteur sur le charbon des poules, a agi sur l'ensemble des leucocytes, tandis que les procédés mis en œuvre auparavant laissaient toujours indemnes un certain nombre de cellules qui suffisaient à la protection de l'animal.

La gestation, comme le froid, diminue la résistance de tous les éléments cellulaires.

Tous ces faits mettent encore en relief la différence entre l'immunité pénible à acquérir, mais durable, donnée par les vaccins charbonneux, et celle presque immédiate, mais fugace, qui suit l'injection du sérum anti-charbonneux.

C'est grâce aux bienveillants conseils de M. Metchnikoff que j'ai pu suivre de près les phénomènes de réaction phagocytaire. Je tiens à lui en témoigner ma reconnaissance.

CONCLUSIONS

De l'ensemble de ce travail, je tirerai les conclusions suivantes :

1^o Le sérum des animaux amenés progressivement à supporter de très fortes doses de cultures charbonneuses en bouillon acquiert une propriété spéciale;

2^o Ce sérum possède des qualités préventives indiscutables ;

3^o Il est curatif;

4^o Après l'injection du sérum, on observe une excitation passagère de la réaction phagocytaire, qui aboutit à la destruction des bactéridies.

Chez les animaux vaccinés par les virus atténués, les bactérides sont aussi détruites par les phagocytes, mais chez eux la résistance phagocytaire est très durable.

SUR LA NUTRITION INTRA-CELLULAIRE

PAR E. DUCLAUX.

(TROISIÈME MÉMOIRE¹.)

Je me suis surtout préoccupé, en étudiant la nutrition intra-cellulaire dans d'verses espèces microscopiques, d'en montrer toute la complexité, et de réagir contre les notions trop simplistes qui sont entrées dans la science à la suite des études faites sur la fermentation alcoolique. On ne saurait méconnaître, en effet, que l'étude de la levure de bière, qui *devait* être la première faite dès que M. Pasteur a eu clairement dévoilé le caractère vital des phénomènes de fermentation, n'ait donné de mauvaises habitudes d'esprit aux chimistes.

Comme ferment, la levure de bière a des propriétés très particulières, très spéciales, qu'on s'est trop hâté de généraliser. Elle ne consomme guère qu'une seule espèce d'aliment, les sucres, et encore seulement certains sucres. La transformation qu'elle leur fait subir est toujours à peu près la même, les produits de fermentation sont toujours à peu près identiques, quelles que soient les races de levures et les conditions de la fermentation. C'est cette constance dans l'action qui a fait la fortune industrielle des levures, et, par une répercussion inévitable, c'est l'importance industrielle des levures qui a attiré sur elles, dès l'origine, l'attention des savants.

C'est pour des raisons analogues que la maladie charbonneuse a été la première bien caractérisée et bien étudiée parmi les maladies virulentes. La bactéridie charbonneuse est en quelque sorte *une* dans ses manifestations, lorsqu'elle envahit un animal sensible à son action. Elle ne tient qu'un compte très relatif des différences de résistance individuelles ; elle domine la scène dès qu'elle y pénètre. Elle est *simple*, et c'est là ce qui a fait sa fortune, tant dans la science vétérinaire qu'au laboratoire.

1. Voir t. III de ces *Annales*, p. 97 et 443.

La levure est de même simple quant à la nature de son aliment et aux transformations qu'elle leur fait subir. Une fois la fermentation terminée, elle s'immobilise, reste à peu près inerte, et les modifications que peut subir le liquide fermenté, vin, bière ou cidre, sont l'effet d'autres végétations cryptogamiques, vivant aux dépens des matériaux respectés par la levure, ou de ceux qu'elle même a produits.

J'ai essayé de réagir contre ces notions en montrant qu'elles n'avaient pas le caractère absolu qu'on leur attribuait. J'ai fait voir que la levure peut vivre aux dépens d'autres aliments que les sucres dits fermentescibles; qu'elle peut aussi devenir un agent de décomposition des matières albuminoïdes; que dans le lait, par exemple, elle peut sécréter une diastase rendant la caséine assimilable et capable de lui fournir l'azote. J'ai montré, d'un autre côté, que lorsqu'on laisse la levure au contact des corps qu'elle a produits dans l'acte de la fermentation, il y en a un au moins qu'elle ne respecte pas et qu'elle détruit peu à peu : la glycérine¹.

Enfin, une série de travaux, pour la plupart sortis de mon laboratoire, a montré que lorsqu'on étudie de près des fermentes moins fixés que les levures, on leur trouve des caractères très différents de ceux du ferment alcoolique. Leur action n'est pas univoque. Ils peuvent s'attaquer à des aliments très variés; avec le même aliment, ils ne donnent pas toujours les mêmes produits. Il intervient, en dehors de l'influence déjà connue de l'aération, une influence de l'âge de la semence, de son éducation antérieure et, par suite, de son origine, de la réaction du milieu, de la durée de la fermentation, etc. Et ces influences, en apparence d'ordre secondaire, amènent dans la qualité et dans la quantité des produits de la réaction, des variations hors de toute proportion avec celles qu'on pourrait observer dans les mêmes conditions avec les levures².

1. Ces *Annales*, t. III, p. 445.

2. On n'a pu considérer comme certains les phénomènes de cet ordre que le jour où on a pu être assuré de la pureté absolue du ferment mis en œuvre. C'est l'incertitude sur ce point qui rend douteux les résultats obtenus dans cet ordre d'idées avant les travaux de M. Pasteur, et même ceux de cet illustre savant sur la fermentation butyrique, ceux de Fitz sur divers bacilles, etc. Il faut en venir, pour avoir toute assurance à ce sujet, aux travaux de M. P. Frankland et ses collaborateurs, de M. Beyerinck, et à ceux de MM. Fernbach, Gessard, Grimbert, Kayser, Perdriz, Pétré, parus dans ces *Annales*.

En un mot, la levure n'est pas le type général de la cellule ferment. C'est un type simplifié, dont les propriétés ont pris, sans doute à la suite d'une éducation séculaire dans des milieux toujours à peu près les mêmes, une stabilité très grande qu'il ne faut pas s'attendre à rencontrer, au moins au même degré, dans les cellules des autres ferment.

Je voudrais aujourd'hui, aux exemples déjà fournis, en ajouter deux autres encore plus topiques, possédant à un très haut degré cette variabilité dans l'action et dans la fonction que je viens de signaler. Les ferment déjà connus sont ou bien des ferment des matières hydrocarbonées ou des ferment des matières azotées. Même les ferment lactiques de M. Kayser, qui, comme l'a montré ce savant, peuvent donner de l'acide lactique aux dépens des matières albuminoïdes, ne le font que péniblement. On voit qu'ils ne s'accommodent guère de cet aliment, et qu'ils sont, de préférence, des ferment des sucres. Les deux microbes dont je vais parler, surtout le premier, sont au contraire, à peu près indifféremment, des ferment des matières hydrocarbonées ou des substances albuminoïdes, et fabriquent à leurs dépens les mêmes produits. Ils sont aérobies ou anaérobies, à volonté. De plus, avec la même substance, ils peuvent donner, suivant le cas, des fermentations si différentes qu'on peut légitimement se demander où sont leurs caractères spécifiques. On n'en trouve pas dans l'étude de leurs formes, car ils ressemblent à beaucoup d'autres bacilles ferment déjà étudiés. En somme, leur étude laisse tellement indistincte la notion d'*espèce*, qu'il faut être bien assuré d'avoir toujours affaire au même être pour ne pas croire qu'on a affaire à des espèces distinctes. Bref, en les rapprochant de leurs voisins déjà connus, on est amené à se poser une foule de problèmes de physiologie dont nous essaierons de résoudre quelques-uns. Mais exposons d'abord les faits : nous en tirerons ensuite les conséquences.

I. — AMYLOBACTER BUTYLICUS*

Les deux bacilles dont j'ai à parler ont été rencontrés tous deux dans une macération stérilisée de fragments de pommes de terre, ensemencée avec une parcelle de terre végétale. Il s'y était produit une fermentation très rapide et très régulière, et la

culture examinée au microscope était, en apparence, très homogène. Dans une série d'ensemencements successifs, on avait vu les mêmes phénomènes se reproduire et les produits de la fermentation de l'amidon avaient été les mêmes, à savoir : des acides acétique et butyrique, et en plus un alcool qui, par comparaison entre le nombre de gouttes et la densité, par les procédés que j'ai indiqués dans ces *Annales* (t. IX, p. 575) se rapprochait de l'alcool propyle, mais sans se confondre avec lui. Ainsi dans un cas, j'ai relevé pour une densité de 0,9965 un nombre de gouttes égal à 143. Avec l'alcool propyle pur, on eût dû avoir 126 gouttes. Il y avait donc un mélange. Une étude plus soigneuse m'a montré que cet alcool, soumis à la distillation, laissait passer, dans les premières portions du liquide distillé, un alcool peu soluble dans l'eau et qui était de l'alcool butylique ; à cet alcool butylique était mélangé de l'alcool ordinaire et un peu d'aldéhyde.

Dès lors, il devenait possible, sinon probable, que, malgré son homogénéité apparente, la culture contenait deux bacilles différents, que les cultures successives dans des milieux divers n'avaient pas réussi à séparer. Disons tout de suite que tel était le cas, et qu'il a suffi d'une culture en strie sur fragment de pomme de terre pour isoler *l'amylobacter butylicus* de *l'amylobacter ethylicus*, que je décrirai plus loin.

Ces deux bacilles sont, en effet, des ferment de l'amidon. Mis en contact avec des fragments de pomme de terre stérilisés dans de l'eau, ils les vident de leur amidon sans toucher à la paroi de la cellule. Les fragments de pomme de terre conservent leur forme, et leurs angles s'émoussent à peine. Tout le tissu cellulaire est conservé intact. Ces deux bacilles sont donc tout différents de ceux qui, dans les mêmes conditions, sur des fragments de pomme de terre crue, détruisent la cellulose sans toucher à l'amidon, et qu'on pourrait appeler des *cytobacters*. J'ai rencontré plusieurs de ces derniers dans mes expériences, et aucun n'a consenti à transformer de l'amidon cru, quelle que fût sa provenance. Par contre, les ferment de l'amidon que j'étudie dans ce travail respectent le tissu cellulaire, même cuit, même choisi parmi les plus tendres, tels que celui de l'endive, du navet, du radis, ou de la jeune tige de chou.

Tous ces êtres, *cytobacters* et *amylobacters*, se ressemblent

tant par leurs formes que ce serait perdre son temps que de les décrire une fois de plus. Ce sont partout des bacilles dont la largeur et la longueur varient avec le milieu de culture, cylindriques lorsqu'ils sont jeunes, se renflant plus ou moins quand ils vieillissent, en un point où apparaît la spore. Chez la plupart d'entre eux, de même du reste qu'avec des bacilles qui ne consomment ni amidon ni cellulose, la formation de la spore est précédée d'une période où une partie du protoplasme du bacille se colore par l'iode¹.

Sila forme ne donne aucun moyen de distinguer les espèces, et si, en outre, la fonction est variable, comme je l'ai dit plus haut, on pourra me demander pourquoi je considère comme distinctes les espèces que je vais décrire, et aussi pourquoi je considère chacune d'elles comme pure. Quelle peut être la caractéristique de l'espèce en dehors de la forme et de la fonction? Telle est, en effet, la question que nous aurons à nous poser en terminant.

Méthodes d'analyse. Un mot d'abord sur les procédés que j'ai employés pour l'étude des liquides fermentés. *L'amylobacter butylicus* donne, comme produits de fermentation, de l'alcool butylique², de l'acide acétique et de l'acide butyrique; parfois, mais pas toujours, de l'acide lactique, qui n'est jamais qu'en proportions très faibles.

L'alcool se sépare par distillation du liquide neutralisé, et se dose au compte-gouttes, d'après la méthode que j'ai décrite (ces *Annales*, t. IX, p. 575). Il faut dire tout de suite qu'il y a toujours des pertes d'alcool butylique dans le liquide en fermentation, à moins qu'on ne prenne des précautions spéciales. La volatilité de cet alcool, à la température de l'étuve, est plus grande que celle de l'alcool ordinaire : l'évaporation ou les gaz qui se dégagent en entraînent des quantités sensibles. Le dosage de ce qui en reste ne donne donc qu'un chiffre approximatif. Mais un dosage exact n'aurait d'importance que si on voulait établir une équation

1. Beyerinck a proposé, dans un travail récent, d'appeler *granulobacters*, les bactéries jouissant de cette propriété. Je ne vois aucune raison pour donner un nom commun à des êtres ayant des fonctions aussi diverses que ces bacilles capables de se colorer par l'iode au moment de la formation de la spore.

2. Je laisse de côté la nature de cet alcool qui m'a paru être, suivant la substance attaquée, tantôt l'alcool normal, tantôt l'alcool isobutylique. C'est une question à reprendre.

de la fermentation, et nous verrons bientôt que cela est impossible. Pour les acides volatils, on les dose par les procédés de distillation fractionnée que j'ai fait connaître dans ces *Annales*, (t. IX, p. 265). Les exemples que je cite dans ce mémoire sont précisément empruntés au travail que je publie aujourd'hui, ce qui me dispense d'entrer dans aucun détail sur la méthode.

Enfin, l'acide lactique est extrait par l'éther du résidu d'évaporation des liquides volatils, préalablement évaporé à consistance sirupeuse. Il est bon, en prévision de la recherche de cet acide, de n'ajouter au liquide saturé, duquel on a retiré l'alcool par distillation, que la quantité d'acide sulfurique ou tartrique strictement nécessaire pour mettre en liberté les acides de fermentation.

Action de l'A. butylicus sur l'amidon. Cela posé, examinons l'action de notre bactérie sur l'amidon cuit. Il se développe très bien dans des empois d'amidon faits dans de l'eau de touraillons ou additionnés de bouillon Liebig. Il les liquéfie assez rapidement, puis les acidifie et la fermentation s'arrête. Elle marche beaucoup plus vite et devient beaucoup plus complète quand on ajoute du carbonate de chaux. Mais elle ne se fait pas de même que sans craie.

Les différences portent surtout :

1^o Sur la proportion de l'alcool produit à l'amidon disparu. Comme nous l'avons dit plus haut, le dosage de l'alcool est toujours incorrect, et, par conséquent, le rapport dont nous parlons n'est jamais exactement connu; mais on peut admettre, dans une première approximation, que pour des flacons égaux, contenant la même quantité de liquide, et placés pendant le même temps dans la même étuve, les pertes en alcool sont proportionnelles aux quantités produites, de sorte que si a est la quantité d'alcool dans un liquide et $k a$ la quantité perdue, la quantité qui reste et qu'on mesure est $a - k a = a(1 - k)$. k étant constant, la quantité mesurée est proportionnelle à la quantité produite, et son rapport à la quantité d'amidon disparue est connue à un facteur constant près, qui est le même dans deux ou plusieurs expériences comparatives.

2^o Ce qui diffère aussi, d'une fermentation avec craie à une fermentation sans craie, dans une mesure beaucoup plus large que le rapport ci-dessus, c'est la proportion des acides volatils

produits, que nous évaluerons en acide acétique, pour plus de simplicité.

3^e Enfin le rapport R de l'acide butyrique à l'acide acétique est aussi très variable, bien que toujours supérieur à l'unité.

Pour donner une idée de ces variations, j'ai résumé, dans le tableau ci-dessous, l'étude de six fermentations faites avec l'amidon du riz, du tapioca et de la semoule, avec et sans carbonate de chaux. La première colonne de chiffres donne, en centimètres cubes, les quantités d'alcool produites par 100 grammes d'amidon disparu, au moment où la fermentation est arrêtée. La seconde colonne de chiffres donne en grammes la quantité d'acides volatils produite dans les mêmes conditions, ces acides étant évalués en acide acétique. On trouvera ensuite les diverses valeurs du rapport R tel que nous venons de le définir, et l'indication de la présence ou de l'absence de l'acide lactique.

		Alcool en c. c.	Acide volatil. en gr.	Rapport R.	Acide lactique.
Riz	avec craie.....	43	9,3	2,0	pas.
	sans craie.....	6	5,3	1,8	un peu.
Tapioca	avec craie.....	42	5,6	1,0	pas.
	sans craie.....	5	2,3	5,0	un peu.
Semoule	avec craie.....	5	10,0	1,0	pas.
	sans craie.....	traces	1,4	10,0	pas.

On relève bien dans ce tableau quelques faits concordants. Ainsi le rendement en acide est toujours plus grand avec craie que sans craie : c'est ce que M. Grimbert avait déjà observé pour son *Bacillus orthobutylicus*. Il avait trouvé aussi le rendement en alcool butylique plus grand sans craie qu'avec craie. Ici c'est l'inverse. Mais ce qui ressort surtout de ce tableau, c'est non seulement que les divers amidons étudiés ne se comportent pas de même, mais encore que l'effet de l'absence ou de la présence du carbonate de chaux n'amène pas les mêmes variations dans le rapport R ou dans la présence ou l'absence de l'acide lactique.

Il y a un autre fait à remarquer. Ces fermentations ont été arrêtées lorsqu'elles ont paru terminées. Même en tenant compte de ce que les fermentations sans craie s'arrêtent alors qu'il reste encore beaucoup, non plus d'amidon, mais de dextrine, on voit que le rendement est toujours faible, et que la somme de l'alcool

4. Ces *Annales*, t. VII, p. 353.

et des acides volatils dépasse à peine 20 % du poids de l'amidon disparu. Avec le bacille de M. Grimbert, les rendements sont bien plus satisfaisants.

Actions sur les sucres. — Dans ces essais, l'amidon donne de la dextrine et un sucre, qui est la substance fermentescible. Je n'ai pas cherché si c'est du glucose ou du maltose. Voyons si les phénomènes ne se simpliferaient pas en donnant au bacille un sucre à attaquer. Pour simplifier encore plus, ne comparons que les fermentations de divers sucres faites en présence de craie. Elles sont très actives au début, se ralentissent ensuite à cause de la présence de l'alcool butylique produit, mais peuvent être complètes si la proportion originale du sucre n'était pas trop forte. Celles qui suivent ont été faites avec environ 60% de sucre, et arrêtées aussitôt que le liquide s'est éclairci. Il restait encore un peu de sucre qu'on a dosé, et on a rapporté les résultats de l'analyse, comme précédemment, à 100 grammes de sucre.

	Alcool butylique en c. c.	Acide volatil en gr.	Rapport R. —
Saccharose	28	40	0,8
Maltose.....	40,5	7,2	0,9
Lactose	15	21	1,5

Les différences entre les sucres sont à peu près du même ordre qu'entre les amidons. Il faut remarquer que le saccharose fermente sans être interverti. C'est une ressemblance avec le bacille de Grimbert.

Il n'est pas probable que de pareilles différences soient dues à des différences de constitution entre les sucres. Il faut donc qu'elles tiennent aux bacilles, et, dès lors, on est amené à se demander si, durant toute la vie du microbe dans son milieu de culture, la formule de son action est la même. Si elle change avec le temps, avec les facilités plus ou moins grandes de contact avec l'oxygène, on comprend que ces fermentations de sucre ou d'amidon, qui marchent inégalement bien, qui s'accompagnent de dégagements gazeux plus ou moins abondants, qui durent plus ou moins longtemps, puissent être en effet différentes sous une apparente uniformité.

Pour nous renseigner sur ce sujet, il n'y a qu'à mettre en fermentation un volume assez grand d'empois d'amidon pour qu'on puisse y prélever, de temps en temps, des prises suffisantes

pour l'analyse, en laissant le reste du liquide continuer sa transformation.

J'ai opéré sur deux fermentations parallèles, portant chacune sur 1200 c. c. de liquide contenant du bouillon Liebig et 10/0 de saccharose; à l'une d'elles on avait ajouté 5 grammes de carbonate de chaux. Le lendemain de l'ensemencement, la fermentation était déjà active, surtout dans le ballon avec craie. A divers intervalles on a prélevé une portion du liquide pour en faire l'étude. Le tableau qui suit résume les résultats. Les chiffres de chaque dosage partiel ont été rapportés au volume total du liquide, de sorte que la marche de la fermentation se trouve écrite dans ce tableau.

Fermentation sans carbonate de chaux.

	Alcool butylique en c.c.	Acide acétique en gr.	Acide butyrique en gr.	Rapport R
Après 4 jours	—	—	—	—
— 13 —	0,22	0,27	0,97	2,5
— 20 —	4,10	0,39	0,81	4,4
	3,86	0,35	0,77	4,5

Fermentation avec carbonate de chaux.

Après 5 jours	0,40	0,84	2,48	2,0
— 13 —	4,06	0,81	5,94	5,0
— 25 —	1,14	0,74	4,38	4,0

Étudions d'abord la fermentation sans craie. Nous voyons que pendant les quatre premiers jours, c'est surtout de l'acide butyrique qui prend naissance. Puis, du 4^e au 13^e jour, c'est presque exclusivement une fermentation butylique. A partir de ce moment, l'action se continue par une combustion partielle des acides volatils formés, l'acide butyrique étant brûlé un peu plus activement que l'acide acétique. ainsi qu'en témoigne dans l'ensemble la diminution du rapport R du 4^e au 20^e jour. Quant à l'alcool, la perte constatée peut être attribuée à l'évaporation, les deux ballons étant fermés par un tampon d'ouale.

Dans la fermentation en présence du carbonate de chaux, les phénomènes sont tout différents. La fermentation est surtout butyrique. La proportion d'alcool reste faible. Puis du 13^e au 25^e jour, nous voyons encore les deux acides se brûler, et, cette fois encore, l'acide butyrique plus vite que l'autre, ainsi qu'en témoigne la diminution de R du 13^e au 25^e jour.

Cette combustion produite par le microbe se manifeste par

l'apparition à la surface du liquide d'une couche craquelée, irrégulière, mince, mais assez résistante, et tombant par grandes plaques quand on agite ; c'est du carbonate de chaux. Voici donc un bacille qui est pour ainsi dire à volonté, avec les sucres, ferment butylique ou ferment butyrique, suivant que le liquide est acide ou neutre ; qui est à la fois anaérobiose absolue, puisqu'il peut se développer dans le vide, et aérobiose absolue, puisqu'il peut devenir un agent de combustion, et même, comme le mycoderme du vinaigre, brûler les acides qu'il a fournis.

Voyons si les choses marchent toujours de même. Cette fois je me suis servi de cristaux de sucre de premier jet, encore colorés, que j'ai fait simplement dissoudre dans l'eau, en proportion de 1,40/0, avec addition de carbonate de chaux. L'expérience est résumée dans le tableau suivant, construit comme ceux qui précédent.

Fermentation avec carbonate de chaux.

	Alcool butylique en c. c.	Acide acétique en gr.	Acide butyrique en gr.	Rapport R. —
Après 15 jours	—	0,29	3,36	10
— 33 —	2,7	2,03	4,55	3
— 70 —	4,8	0,45	4,90	20
— 100 —	1,5	0,0	4,40	∞

Ici la fermentation du début, jusqu'au 15^e jour, a été presque exclusivement butyrique, et jusqu'à ce moment, le ferment pourrait être identifié avec le ferment butyrique de Pasteur ou les autres ferment butyriques décrits depuis. Il est vrai qu'il y a un peu d'acide acétique produit, en dehors de l'acide butyrique ; mais j'ai démontré¹ que tel était le cas avec les ferment butyriques les plus usuels.

Dans la seconde quinzaine de la fermentation, c'est au contraire, la fermentation butylique qui a prédominé, accompagnant une production plus abondante d'acide acétique. Quant à l'acide butyrique, il a peu varié, et le rapport R a, par suite, beaucoup diminué. Vers le 40^e jour, il ne restait plus que des traces de sucre, et, à partir de ce moment, l'action du bacille s'est surtout portée sur les produits formés pendant la première période. L'acide acétique a été brûlé peu à peu, et si complètement, qu'il n'en reste plus trace au 100^e jour. L'acide butyrique, qui, cette

1. *Annales de ch. et de phys.* T. VIII, 6^e S.

fois, a été brûlé beaucoup moins vite que son congénère, reste tout à fait pur, si bien qu'on pourrait croire, en étudiant la fermentation à ce moment, qu'elle a été exclusivement butyrique. On voit pourtant par quelles transitions elle a passé.

Revenons maintenant aux fermentations d'amidon, par lesquelles nous avons commencé, et voyons si elles se comportent de même. Deux fermentations, portant chacune sur 20 grammes d'amidon, amenés à 1200 grammes d'empois avec un peu de bouillon Liebig, et faites comparativement l'une en présence et l'autre en l'absence de carbonate de chaux, ont donné les résultats suivants :

Amidon sans carbonate de chaux.

	Alcool butylique en c. c.	Acide acétique en gr.	Acide butyrique. en gr.
Après 2 jours	0,97	Pas.	4,09
— 6 —	0,60	0,320	4,06

Amidon avec carbonate de chaux.

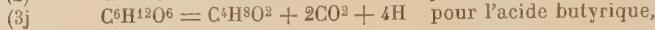
Après 2 jours	Pas.	0,45	4,65
— 7 —	0,8	0,70	3,02
— 43 —	0,16	0,23	3,03

Dans leur ensemble, ces résultats sont d'accord avec ceux que nous ont donnés les sucres. Il y a plus d'alcool et moins d'acide butyrique produits lorsqu'il n'y a pas de craie, mais la différence est moins grande qu'avec les sucres. On voit que les trois corps formés sont en proportions très variables, et nous nous expliquons bien que dans nos premières fermentations, qui, ayant marché très inégalement, avaient été interrompues à divers intervalles, nous ayons trouvé toutes les irrégularités apparentes que nous avons signalées.

Formule de la fermentation. — Il est évident que s'il est déjà difficile d'établir une formule pour une fermentation aussi constante que la fermentation alcoolique, cela est impossible pour celle à laquelle préside notre bacille, qui, d'un même aliment, fait des produits si nombreux et si variés. Mais on peut se demander si l'acte physiologique de son protoplasma ne serait pas la superposition en proportions variables de trois actes physiologiques principaux, aboutissant chacun à la production de l'un des corps : alcool butylique, acide acétique et acide butyrique.

Ces trois actes pourraient être régis par les trois formules

suivantes, écrites en prenant le glucose comme point de départ

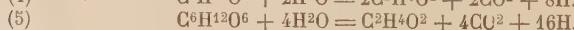
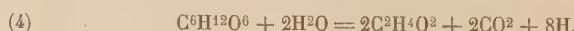


Il est facile de comprendre, sans qu'il soit besoin d'insister, que l'un quelconque des résultats expérimentaux trouvés ci-dessus peut être théoriquement représenté par une combinaison convenable des trois équations ci-dessus. Supposez, en effet, qu'on ait trouvé dans le liquide fermenté p molécules d'alcool butylique, q molécules d'acide acétique et r molécules d'acide butyrique, on pourra représenter l'ensemble des résultats par l'équation suivante :



Cette formule sera exacte si chacune des formules qui la composent est exacte, mais il importe de remarquer qu'on ne pourrait conclure inversement, de la vérification de l'équation complète, à celle de chacune de ses équations composantes, que si la vérification numérique avait porté sur tous les éléments, aussi bien les corps formés que les gaz produits. Il faudrait, par exemple, dans le cas précédent, que le nombre de molécules d'acide carbonique produit soit égal à deux fois le nombre total de molécules d'alcool butylique et d'acide butyrique trouvé; qu'il y ait quatre fois autant de molécules d'hydrogène que d'acide butyrique, etc.

Il existe, en effet, d'autres systèmes d'équations pouvant fournir, pour une même quantité de sucre mis en action, des quantités de gaz ou d'acides différentes de celles des équations précédentes. Par exemple, la seconde, celle qui explique la formation d'acide acétique par un dédoublement du sucre, n'est pas *a priori* plus vraie que l'une des deux équations suivantes :

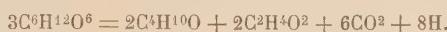


Et on pourrait de même trouver des équations impliquant une combustion partielle de l'acide butyrique aux dépens des éléments, soit de l'eau, s'il s'agit d'une culture anaérobie, soit de l'oxygène de l'air, s'il s'agit de culture aérobie. Dans les deux cas, la quantité

d'acide volatil diminue, la quantité d'acide carbonique augmente.

Quelques unes de ces équations peuvent-être *impossibles* au point de vue de la thermochimie, c'est-à-dire qu'elles peuvent impliquer non pas une production, mais une consommation de chaleur. Elles sont peut-être incapables de se réaliser à l'état isolé, mais dans un ensemble physiologique comme celui que nous constatons dans notre bactérie, une réaction faiblement exothermique ou même un peu endothermique peut très bien coexister avec d'autres réactions exothermiques. C'est, en effet, par un artifice de l'esprit que nous les séparons : elles marchent ensemble et se soudent dans la réalité.

Au cas, par exemple, où la première des équations qui précèdent, qui implique la dislocation de 2 molécules d'eau, serait thermiquement impossible, on peut la souder à l'équation n°1, qui implique la formation d'une molécule d'eau dans la formation de l'alcool butylique ; on aurait alors l'équation résultante.



On n'a pas le droit d'exclure des réactions de cet ordre, et on voit, en revenant à notre point de départ, qu'il ne suffit pas de constater de l'acide acétique dans les produits d'une fermentation pour pouvoir conclure à l'intervention de l'équation (2), qui implique un dédoublement du sucre. Il se peut que l'action soit plus profonde, et nous n'en serons avertis que par l'étude comparative des gaz dégagés et des produits formés pendant la fermentation. Jusqu'ici nous n'avons pas fait cette étude à propos de notre bactérie : voyons ce qu'elle donne.

Études des gaz de la fermentation. — On peut faire cette étude en imposant au bacille une vie aérobie ou anaérobiose ; cette dernière, qui supprime l'intervention de tout gaz extérieur, est évidemment la plus intéressante. Onensemence le bacille dans un liquide sur lequel on fait ensuite le vide au moyen d'une trompe à mercure, qui sert à recueillir les gaz formés à divers intervalles. Si, à chaque prise, on fait le vide à nouveau, de façon à évacuer tous les gaz produits (sauf la petite quantité d'acide carbonique qui donne du bicarbonate stable dans le vide, lorsqu'on a mis de la craie), on peut fractionner en autant de parties qu'on veut la fermentation totale. Il y a un léger inconvénient

à opérer ainsi : on perd un peu d'alcool butylique, qui s'évapore dans le vide à la température de l'étuve, et va se condenser dans les parties froides de l'appareil, où il est difficile de le recueillir. Mais cela n'a pas grande importance, tant qu'on ne veut pas pousser l'étude dans le détail et qu'on se contente d'indications générales.

Remarquons, en effet, que dans l'hypothèse où les phénomènes seraient représentés par les 3 équations (1), (2) et (3), la formation d'alcool butylique n'entraîne aucun dégagement d'hydrogène. Ce gaz est un témoin de la formation d'acide butyrique, et son volume est alors égal à celui de l'acide carbonique. Il ne peut que lui être inférieur s'il y a production d'alcool. Si donc il le dépasse, c'est qu'il entre en jeu une transformation non écrite dans ces formules, par exemple une transformation comme celle que résume l'équation (4), où le volume de l'hydrogène dépasse celui de l'acide carbonique.

Voyons ce que donne à ce sujet l'expérience. En même temps que je mettais en train les fermentations d'amidon dont j'ai parlé endernierlieu (p. 824), je faisais une fermentation anaérobiose d'un peu du même liquide dans un petit matras en relation avec une trompe à mercure. Le surlendemain, 19 mai, la fermentation étant bien en train, j'ai fait le vide : les gaz recueillis avaient la composition suivante :

Hydrogène	54,5 c. c.	soit 59,4 0/0
Ac. carbonique	37,3	— 40,6 —

Les 22 et 24 mai, on fait deux nouvelles prises, en poussant à chaque fois jusqu'au vide :

	22 mai.	24 mai.
Hydrogène	58,0 c. c. soit 48,9 0/0	7,5 c. c. soit 20,0 0/0
Ac. carbonique	62,0 — 54,4 —	30,0 — 80,0 —

On voit que l'hydrogène, après avoir atteint, à l'origine, une fois et demie le volume du gaz carbonique, n'en est plus que le quart à la fin. Ce fait est d'accord, dans ses traits généraux, avec celui que nous avons découvert plus haut, que la fermentation de l'empois d'amidon, en présence de craie, est surtout butyrique au début. Mais cela ne nous explique pas que l'hydrogène soit en excès sur l'acide carbonique.

Dans l'ensemble, il y a eu un dégagement fait de

Hydrogène 120 c. c. soit 48 0/0
 Ac. carbonique 129,3 — — 52 —

Mais une partie de cet acide carbonique provient du carbonate de chaux décomposé par les acides butyrique et acétique produits pendant la fermentation. On trouve, par les méthodes indiquées, qu'il y a dans le liquide, en dehors de 0,008 c. c. d'alcool butylique, 0,021 grammes d'acide acétique et 0,245 grammes d'acide butyrique, ayant dégagé environ 40 c. c. d'acide carbonique dans les conditions de l'expérience. En les retranchant on trouve :

Hydrogène 120 c. c.
 Ac. carbonique 90 c. c.

provenant exclusivement des matériaux du sucre, la fermentation ayant été anaérobie du commencement à la fin. On voit que le volume d'hydrogène dépasse notablement celui de l'acide carbonique.

J'ai trouvé de même, dans une fermentation d'empois d'amidon avec un peu de bouillon Liebig, mais sans carbonate de chaux, que le volume d'hydrogène, après avoir été à l'origine une fois et demie celui de l'acide carbonique, n'en était plus que le quart à la fin, et que, dans l'ensemble, les gaz de la fermentation avaient la composition suivante :

Hydrogène 66,6 c. c. soit 43,4 0/0
 Ac. carbonique 84,2 — — 56,6 —

Ici le volume de l'hydrogène est encore inférieur à celui du gaz carbonique, mais en retranchant de ce dernier tout ce qui correspond à la formation des 0,06 c. c. d'alcool butylique trouvé dans le liquide, en les supposant formés suivant l'équation (1), on trouve encore que le volume de l'hydrogène dépasse d'une dizaine de c. c. le volume de l'acide carbonique.

Avec cet empois d'amidon, la fermentation est incomplète, capricieuse, et ses résultats sont difficiles à interpréter. Voyons si nous ne trouverions pas mieux en faisant fermenter du sucre.

Le jour même où ont été faites les expériences relatées p. 819, j'ai mis dans les deux branches d'un tube Pasteur un liquide contenant 0,590 grammes de sucre candi avec un peu de bouillon Liebig. Dans l'une des branches, il y avait un peu de carbonate

de chaux ; dans l'autre, non. J'ensemence d'abord cette dernière et je fais le vide dans l'appareil.

Le dégagement gazeux commence au bout de quelques heures. 3 jours après, il semble se ralentir ; j'extrais le gaz par le vide. Cinq jours après, la fermentation semblant être arrivée aussi loin qu'elle peut aller dans ces conditions, je fais le vide à nouveau. Les gaz dégagés avaient la composition suivante :

	ap. 3 jours.	ap. 5 jours.	en tout.
Hydrogène	25,2 c. c. ou 62,2 0/0	1,0 c. c. ou 18,2 0/0	26,2 c. c.
Ac. carbonique	45,3 — 37,8 —	4,5 — 81,8 —	19,8 —

Ici le volume de l'hydrogène dépasse notablement celui de l'acide carbonique, c'est que la transformation en est restée à ses premiers stades ; le sucre candi fermente difficilement dans ces conditions. On ne trouve, en effet, dans ce liquide que des traces indosables d'alcool butylique et d'acides volatils.

La branche contenant la craie a été ensemencée avec la première, aussitôt que la fermentation y a été terminée, et toujours dans le vide. Le lendemain, le dégagement gazeux était en pleine activité. Les gaz, retirés par le vide le lendemain de l'ensemencement, après 7 jours, et après 22 jours, avaient la composition suivante :

	Après 1 jour c. c.	Après 7 jours c. c.	Après 22 jours c. c.
Hydrogène.....	—	31,4	18,0
Acide carbonique.....	37,7	34,2	24,2

La proportion d'hydrogène va toujours en décroissant du commencement à la fin, ce qui est un fait général sur lequel nous reviendrons tout à l'heure. Dans l'ensemble, on a trouvé :

Hydrogène.....	59,3 c. c., soit 38,2 0/0.
Acide carbonique.....	96,4 — — 61,8 —

Une partie de cet acide carbonique provient du carbonate de chaux. En en retranchant tout ce qui correspond aux 0^{gr}, 107 de chaux dissoute trouvés dans le liquide, on trouve qu'il reste 55 c. c. environ d'acide carbonique contre 59 c. c. d'hydrogène, c'est-à-dire encore un petit excès d'hydrogène. Et nous ne comptons pas la quantité d'acide carbonique provenant de la petite quantité d'alcool butylique qui se forme, et dont il reste, toutes pertes par évaporation négligées, 0^{gr},008 dans le liquide.

En résumé, lorsque nous essayons de dégager, dans les produits gazeux de fermentation produits par notre bacille, la part d'hydrogène et d'acide carbonique qui proviennent de la matière fermentescible, nous trouvons un excès du premier gaz que n'explique aucune des équations classiques (1), (2) et (3). On ne peut expliquer cet excès qu'en admettant une décomposition de l'eau suivant des formules analogues aux formules (4) et (5) pour l'acide acétique.

Débrouiller exactement ce qui se passe n'est pas facile, si ce microbe est capable dans sa vie anaérobie, comme dans sa vie aérobie, de détruire les corps qu'il a formés. Son acide acétique peut tout aussi bien provenir du sucre que de l'acide butyrique ou même peut-être de l'alcool. Mais ce qui est important, et ce qui résulte de ce que nous venons de dire, c'est que cet acide acétique, ou peut-être aussi cet acide butyrique, résultent d'une combustion intérieure, c'est-à-dire faite aux dépens de l'oxygène déjà combiné dans l'eau.

A vrai dire, cette conclusion n'a pas le droit de surprendre. On sait, en effet, que la fermentation alcoolique du saccharose exige la fixation préalable, sur le sucre, d'une molécule d'eau dont l'oxygène se retrouve en partie dans l'acide carbonique dégagé. Mais il y a, dans ce cas, intervention d'une diastase, dont les effets sont toujours un peu mystérieux. Avec l'acide acétique, ce n'est plus de l'eau déjà introduite dans la molécule, c'est de l'eau de dissolution du sucre qui est décomposée, et la production de cet acide, au lieu de résulter, comme on le croyait, d'un phénomène de dédoublement du sucre, résulte d'une transformation plus profonde, tout à fait analogue à celle qui préside à la formation de l'alcool ou à celle de l'acide butyrique.

Ensemble des produits d'une fermentation anaérobie. — Toutes ces déductions, pour lesquelles nous trouverons bientôt d'autres arguments, reposent jusqu'ici sur l'hypothèse où notre bacille ne donnerait pas d'autres substances que celles que nous avons trouvées. Nos conclusions perdraient, en effet, toute valeur s'il y avait formation d'une substance inconnue dérivant du sucre avec dégagement d'hydrogène. Il est facile de se convaincre qu'il ne se fait rien de pareil. Il n'y a que de l'alcool dans le liquide distillé. Le poids de l'extrait obtenu en évaporant le liquide fermenté correspond à peu près exactement à ce

qu'il contient de sel de chaux, et dans ce sel de chaux, il n'y a pas de traces sensibles d'un acide fixe lorsque la fermentation a été complète et s'est faite en présence de carbonate de chaux. Ainsi, dans une expérience, on a trouvé en tout, dans le liquide fermenté, 0^{gr},684 de chaux, à l'état de sels de chaux. Il est facile, d'un autre côté, de calculer que la quantité de chaux correspondant à la quantité totale d'acides trouvés est de 0^{gr},698. Si on songe que le liquide fermenté en présence du carbonate de chaux reste toujours un peu acide, on s'expliquera qu'on trouve un peu plus de chaux lorsqu'on l'évalue au moyen du titre acide que lorsqu'on la précipite par l'oxalate d'ammoniaque.

Il n'y a donc pas, en quantités sensibles, d'autres acides fixes ou volatils que les acides acétique et butyrique. Quant aux rendements, ils sont naturellement variables suivant les conditions de fermentation. Dans un cas où tout a été mesuré, j'ai trouvé que 3^{gr},5 de sucre, fermentant en présence du carbonate de chaux, avaient fourni :

0,025	grammes d'alcool butylique.
0,226	— d'acide acétique.
0,660	— d'acide butyrique, soit en tout
1,991	— de matériaux divers.

C'est un rendement voisin de celui de la fermentation alcoolique.

Fermentation de la mannite, de la glycérine, du lactate de chaux. — L'amidon et les sucres ne sont pas les seules substances que notre bacille puisse transformer. Comme je l'ai dit, il est remarquablement éclectique au point de vue de la nutrition.

La mannite fermente avec un dégagement gazeux abondant, où l'hydrogène dépasse l'acide carbonique au début et diminue à la fin, comme cela se passe avec les sucres. Les produits de fermentation sont les mêmes qu'avec les sucres, et m'ont paru tout aussi variables avec les conditions de la fermentation.

La glycérine est attaquée sans dégagement gazeux bien apparent, lorsque l'attaque a lieu dans un ballon rempli à moitié et fermé par un tampon de coton. A la surface du carbonate de chaux du fond du vase, on trouve une couche grisâtre formée de bacilles courts, un peu tordus. La fermentation terminée, on trouve, pour 10 grammes de glycérine disparue, environ 2 grammes d'acide butyrique et 2 c. c. d'alcool butylique. Peut-

être s'est-il formé temporairement de l'acide acétique qui a été ensuite brûlé, comme dans l'expérience de p. 820. En tout cas on voit que notre bacille est ici un ferment butyrique pur au regard de l'acide, de même qu'un ferment butylique pur au regard de l'alcool.

Le lactate de chaux fermente avec dégagement gazeux, mais sans donner du tout d'alcool butylique. Il n'y a que des acides volatils que j'ai trouvés, dans une expérience, formés d'acide butyrique mélangé de 1/12 seulement d'acide acétique, c'est-à-dire presque pur.

Ceci nous amène à traiter une question intéressante. La notion de ferment butyrique a été introduite dans la science par Pasteur. Elle était, à ce moment, parfaitement claire, et se rapportait au bacille faisant fermenter le lactate de chaux en culture anaérobiose. Depuis, on a trouvé beaucoup de bacilles dont quelques-uns ne sont pas anaérobies, dont la plupart sont incapables de faire fermenter le lactate de chaux, mais qui tous ont pour caractère commun de donner de l'acide butyrique parmi les produits de la fermentation. On les a tous indistinctement appelés ferment butyriques, et plus ou moins confondus avec le ferment butyrique de Pasteur.

Beaucoup de ces ferment butyriques nouveaux, ceux de Fitz, par exemple, étaient des mélanges d'espèces. Depuis la publication *in extenso*, dans les *Etudes sur la Bière*, des expériences sur la fermentation du lactate de chaux, on s'est aperçu que le ferment butyrique de M. Pasteur n'était probablement pas non plus une espèce unique. Il faut arriver à l'époque où s'est vulgarisé l'emploi des cultures sur gélatine, pour avoir toutes garanties au sujet de la pureté des espèces étudiées. Malheureusement, depuis ce moment, on s'est surtout attaché à distinguer les espèces par les caractères divers qu'elles manifestent sur divers milieux solides. On s'est acharné à décrire par des mots la phisyonomie des cultures, et comme les mots sont moins nombreux que les phisyonomies, la diagnose d'un microbe est devenue tout aussi compliquée et tout aussi incertaine qu'une diagnose psychologique ou une peinture d'état d'âme. Comme je l'ai souvent dit, la véritable diagnose doit être physiologique, non morphologique. Les seuls travaux dans lesquels un bacille ferment donnant de l'acide butyrique ait été assez étudié pour

qu'il soit reconnaissable, sont ceux de M. Perdrix et de M. Grimbert¹. Même M. Beyerinck, si on juge par l'extrait de son mémoire dans le *Jahresbericht* de A. Koch (t. IV) ne réussit pas malgré ses efforts à bien différencier entre eux les bacilles qu'il étudie, et en particulier son *granulobacter butylicum* du *granulobacter saccharo-butylicum*. Les différences dans la fonction qu'il signale ne sont pas caractéristiques de différences dans l'espèce, comme le prouve ce qui précède. Il faut s'abstraire des idées de constance dans l'action pour faire l'étude de ces bacilles.

Le bacille que j'étudie dans ce mémoire diffère de ceux de M. Pasteur en ce qu'il supporte très bien la vie aérobie, et y est même agent de combustion, tandis que les espèces étudiées par M. Pasteur sont des anaérobies pures, que le contact de l'air paralyse et tue. Il diffère, pour les mêmes raisons, des bacilles amylozymes de M. Perdrix. Il se distingue du *Bacillus orthobutylicus* de M. Grimbert en ce qu'il fait fermenter le lactate de chaux. D'une manière générale, il se distingue du *G. butylicum* de Beyerink en ce qu'il est facilement aérobie, du *G. lactobutyricum* en ce qu'il est de propriétés beaucoup plus stables, du *G. polymyxa*, en ce qu'il ne rend pas le liquide gélatineux et donne toujours de l'hydrogène. Mais, malgré ces différences, il manifeste avec ces divers bacilles des ressemblances étroites sur lesquelles nous reviendrons tout à l'heure.

Fermentation de tranches de pommes de terre. — C'est dans un liquide formé d'une macération stérilisée de fragments de pomme de terre que le bacille prospère le mieux. Comme je l'ai dit, il nettoie de son amidon le contenu cellulaire, sans toucher en apparence à la paroi de la cellule, et en respectant la structure du fragment. Si on soumet à une fermentation nouvelle ces fragments, qu'on a lavés au préalable pour les débarrasser des produits de la première fermentation, on obtient parfois une fermentation nouvelle, due, sans aucun doute, aux petites quantités de dextrine que le lavage n'a pas enlevées ; mais cette fermentation est pénible et courte, et aboutit encore à un résidu inattaquable, qu'on peut, si on veut, purifier par une troisième fermentation, mais non faire disparaître. Ce microbe est donc incapable d'attaquer la cellulose du tubercule. Il est également incapable, comme je l'ai dit en débutant, d'attaquer d'autres celluloses de

1. Ces *Annales*, t. V p. 287 et t. VII p. 383.

légumes et de fruits comestibles. Il est de même incapable de faire fermenter la gomme arabique et la gomme de cerisier.

Sur la pomme de terre, pourtant, il se comporte beaucoup mieux que sur des empois d'amidon additionnés de bouillon Liebig ou d'eau de touraillons. C'est même dans ces conditions qu'il donne le maximum d'alcool butylique, environ 25 à 30 % de l'amidon disparu. Evidemment, ce milieu-là est plus favorable que les autres milieux artificiels, et il y avait à se demander pourquoi.

Fermentation des matières albuminoïdes.—En dehors de la cellulose ou des matières gommeuses inattaquables, il n'y a, dans la pomme de terre, que des matières albuminoïdes, et il y avait à se demander si ce bacille n'était pas aussi un ferment des matériaux azotés. Jusqu'ici les diverses espèces microbiennes que nous connaissons sont, de préférence, ou des ferment des matières hydrocarbonées ou des ferment des albuminoïdes. A ses autres originalités, notre bacille joint celle d'être à peu près indifféremment ferment des unes ou des autres.

Voici qui le prouve. Je prépare deux ballons contenant 600 c. c. d'une décoction de touraillons destinée à fournir des sels et un peu de matière hydrocarbonée, et j'y ajoute dans l'un 10 grammes d'albumine sèche du commerce, dans l'autre 20 grammes de fibrine humide fraîche, correspondant à 4 gr. 44 de fibrine séchée à 100°. Le bacille ensemencé dans ces milieux se développe très bien, trouble le liquide et y forme, de plus, une pellicule superficielle faite de bacilles entrelacés. Il y a, outre, un dépôt de fond où on voit un magma de masses amorphes et de bacilles. Après 40 jours d'étuve, tout semble terminé. Les liquides s'éclaircissent et je les étudie.

Le liquide contenant de l'albumine est devenu alcalin, et on y trouve, tant à l'état libre qu'en combinaison, 0 gr. 988 d'ammoniaque. Il ne contient pas d'alcool butylique, mais on y trouve 0 gr. 380 d'acide butyrique et 0 gr. 122 d'acide acétique. Il y a aussi un peu d'acide succinique. Il y reste encore un peu de matière albuminoïde non décomposée, mais ce n'est plus de l'albumine initiale, car le liquide neutralisé ne précipite plus à l'ébullition.

Pour le liquide à fibrine, les résultats sont du même ordre. Il est encore alcalin et contient 0 gr. 320 d'ammoniaque tant libre que combinée. Cette fois, je ne trouve pas d'acide succinique;

il n'y a que le mélange ordinaire d'acides volatils, formé de 0^{gr},020 d'acide acétique et de 0^{gr},250 d'acide butyrique. Il n'y a toujours pas d'alcool.

Ainsi, des trois actions physiologiques qui semblaient caractéristiques de notre bacille, il y en a une qui s'efface, au moins avec les deux matières albuminoïdes que nous avons étudiées, et deux qui persistent. C'est comme dans le cas du lactate de chaux. Mais on peut aussi, comme nous l'avons vu, n'en voir persister qu'une, si on change la matière nutritive ou les conditions de fermentation, et comme l'acide butyrique peut à son tour être brûlé, ainsi que nous nous en sommes assurés, notre microbe, anaérobiose et ferment, capable de se développer dans le vide, nous apparaîtrait alors comme un aérobiose pur, exerçant des combustions aussi puissantes que les mucédinées.

Voici en effet un exemple de combustion, toute pareille, opérée par un *penicillium*. Un matras, contenant environ 50 grammes de pomme de terre coupée en tranches, a été envahi par un *penicillium* gris, tournant au noir, ayant formé, au bout de 6 mois passés à la température du laboratoire, une pellicule épaisse. Au bout de ce temps, je trouve les tranches de pommes de terre vidées de leur amidon; les cellules ne se colorent plus par l'iode, mais elles reprennent cette propriété si on chauffe à l'avance le liquide qui les contient. C'est ce que M. Grimbert avait observé avec son *Bacillus orthobutylicus*, c'est ce que nous avons retrouvé avec le bacille que nous venons de décrire. C'est d'ailleurs le fait général avec les microbes qui consomment facilement l'amidon et s'arrêtent devant la cellulose.

Les 8 à 10 grammes d'amidon de nos tranches de pommes de terre ont donc été détruits. A leur place, on ne trouve qu'environ 0,380 grammes de matière organique, dans laquelle il n'y a que des traces d'acides volatils et un peu d'alcool ordinaire. Il s'est pourtant formé, à un moment de l'action, des sels de chaux dont l'acide était fourni par la matière organique, et la chaux par le carbonate de chaux introduit dans le liquide. La preuve, c'est que dans le mycélium du champignon, aussi bien que dans le dépôt du fond du matras, on trouve des cristaux d'oxalate de chaux et de carbonate de chaux témoignant d'un procès de combustion; mais tout ou à peu près tout ce qui était acide organique a été brûlé. La combustion a même

atteint la matière azotée, car le liquide est alcalin et contient 0,062 grammes d'ammoniaque libre. Ainsi ce *penicillium*, comme le bacille, attaque et dissout l'amidon cuit de la cellule sans toucher à la paroi, le transforme, brûle les acides qu'il a formés, et peut ensuite brûler la matière albuminoïde. Cette identité de fonction, au milieu d'une aussi grande dissemblance de forme, montre que la forme n'est rien et que les enveloppes les plus diverses d'aspect peuvent contenir, non le même protoplasma, mais des protoplasmas que nous ne savons pas encore distinguer par leurs réactions.

Là est, en effet, si je ne me trompe, l'enseignement qui résulte de ce travail. Au début des études microbiologiques, la forme a paru suffire pour établir les grandes divisions du continent nouvellement découvert. Puis on a constaté que la forme ne suffisait pas, et qu'il fallait faire aussi l'étude de la fonction. On admettait plus ou moins explicitement, sur l'exemple de la levure, que cette fonction était constante, ou à peu près constante, dans un même être. Voici maintenant que nous découvrons que cette fonction est variable chez une même espèce : le bacille dont je viens de faire l'étude montre qu'aucune des grandes divisions adoptées, aérobies ou anaérobies, ferment des matières albuminoïdes et des matières hydrocarbonées, n'a de raison d'être bien sérieuse, puisque notre bacille ne les connaît pas.

Il y a plus : nous connaissons déjà au moins 6 bacilles capables de fournir de l'alcool butylique, de l'acide acétique et l'acide butyrique : ce sont le bacille amylozyme de M. Perdrix, le *Bacillus orthobutylicus* de M. Grimbert, 3 au moins des bacilles de M. Beyerinck, s'ils sont distincts, et l'*amylobacter* que nous venons de décrire*. Par conséquent si nous trouvons des propriétés dissemblables chez le même être, nous trouvons en regard des propriétés semblables chez des êtres sûrement diffé-

1. Dans un travail intéressant inséré dans le *Centralbl. f. Bakter. u. Parasitenkunde* (II^e partie, t. I, p. 609 et 637), M. W. Winckler s'est attaché à faire la diagnose sur milieux solides des diverses formes de *Tyrothrix* que j'avais isolées et décrites en 1879, à une époque où on en était réduit aux cultures sur milieux liquides. Les espèces que j'avais distinguées ont bien résisté à cette épreuve nouvelle : mais dans chacune d'elles, M. Winckler a relevé des variétés plus ou moins actives comme ferment ou comme aérobies. Le présent travail confirme la possibilité de ces variations physiologiques, et les montre exagérées dans une même espèce.

rents. Le cas semble embarrassant, car où chercher désormais la caractéristique de l'espèce? Les difficultés augmentent encore quand on songe aux variations qui peuvent résulter de l'éducation de la semence, et de ses antécédents plus ou moins héréditaires. On est tenté de croire et de dire qu'il n'y a plus désormais aucune sécurité à différencier ou à confondre deux êtres de même forme extérieure, et que tous les travaux accumulés dans cette voie ont abouti à l'indécision et à l'obscurité.

Cette conclusion serait à son tour inexacte. Bien qu'ils soient très voisins, nous savons pourtant différencier les bacilles connus comme producteurs d'alcool butylique, d'acide acétique et d'acide butyrique. Admettons que quelques-uns des caractères différentiels sur lesquels nous tablons en ce moment deviennent caducs, on confondra ces espèces si l'étude plus approfondie qu'on en aura faite ne relève pas de différences nouvelles, et si on les sépare encore à ce moment, ce sera à l'aide d'un caractère différentiel encore plus délicat et plus profond, que l'expérience aura découvert. Dans tous les cas, on aura avancé davantage dans l'étude des propriétés du protoplasma ou de la vie cellulaire. Quant à savoir combien nous trouverons d'espèces, et si même nous trouverons des espèces au bout de cette étude, c'est chose très indifférente. Quand nous serons conduits à supprimer la notion d'espèce, c'est que nous aurons appris les lois de leur transition, et il y aura bénéfice pour tout le monde. En attendant, le nom spécifique a juste la valeur d'une étiquette sur un colis : il faut toujours se préparer à la changer ou à la faire disparaître.

L'étude de l'*amylobacter ethylicus* va confirmer ces conclusions et nous en fournir d'autres.

II. — AMYLOBACTER ETHYLICUS

Je serai très bref dans l'étude de ce bacille, car elle peut être presque entièrement calquée sur celle qui précède. J'ai dit que j'avais longtemps cultivé ensemble ces deux bacilles sans arriver à les distinguer. Même forme, mêmes dimensions, ou à peu près, dans le bacille adulte et dans la spore. Les différences qui peuvent exister dans l'aspect des colonies sur divers milieux sont saisissables quand on a les pièces sous les yeux, mais

exigeraient pour leur description un long morceau de littérature inutile.

Les vraies différences résultent de l'étude des fonctions physiologiques, mais elles n'apparaissent pas tout d'abord, car les deux bacilles semblent se comporter de même dans les divers milieux.

Pomme de terre. — Dans une macération stérilisée de fragments de pomme de terre, par exemple, les phénomènes sont les mêmes. Comme son congénère, l'*Amylobacter ethylicus* vide les cellules de leur amidon sans toucher à la paroi. Il se fait de la dextrine et un sucre qui fermentent avec un dégagement gazeux abondant, formé d'hydrogène et d'acide carbonique, où la proportion du premier gaz va en décroissant du commencement à la fin. Ce gaz est pourtant moins abondant qu'avec l'*Amylobacter butylicus*. Dans une fermentation de 20 grammes de pomme de terre en présence du carbonate de chaux, j'ai trouvé en tout environ 160 c. c. d'hydrogène et 400 c. c. d'acide carbonique, dont une très faible partie seulement provenait du carbonate de chaux. L'hydrogène fait donc moins du tiers du volume total.

La présence de ce gaz semble au premier abord inexplicable, car on ne trouve dans le liquide fermenté que de l'alcool ordinaire, de l'acide acétique et de l'acide lactique, tous corps dont la formation aux dépens du sucre ne comporte aucun dégagement d'hydrogène, si on se rapporte aux formules adoptées. La difficulté cesse si on adopte l'interprétation que nous avons proposée au sujet de l'*Amylobacter butylicus*, qui fait dériver l'acide acétique et l'acide lactique d'une combustion interne du sucre au moyen de l'oxygène de l'eau.

Il est difficile de serrer la question de plus près, et de mettre en relation la quantité d'hydrogène dégagé et la quantité d'acide acétique formé, parce qu'il y a deux formules de dérivation de cet acide aux dépens du sucre, précisément les formules (4) et (5) (p. 822), et qu'on ne sait pas si elles ne fonctionnent pas toutes deux à la fois.

Sauf cette différence dans les produits de la fermentation, les deux bacilles se comportent de même. Ils peuvent donner une fermentation en l'absence de carbonate de chaux, mais plus lente et plus incomplète, aboutissant toutefois aux mêmes produits. Ils préfèrent toujours les milieux maintenus neutres ou légèrement acides par la craie.

Pommes de terre et légumes crus. — J'ai eu occasion de faire avec l'*A. ethylicus* une expérience que je n'ai pas faite avec l'autre, celle de l'ensemencement sur des fragments de pommes de terre, de navets, de carottes et de betteraves, fragments prélevés purement à l'état cru sur les racines, et introduits dans un bouillon nutritif. Là où il y avait du sucre, ce sucre, diffusible, a fermenté à la façon ordinaire. Mais la paroi des cellules n'a pas été attaquée. Le seul effet visible a été celui d'une désintégration plus ou moins prononcée des cellules, comme si elles étaient maintenues adhérentes par une substance agglutinante qui se serait dissoute. Au moindre effort, ces cellules disloquées se répandaient dans le liquide, chacune avec son contenu. Celles de la pomme de terre, par exemple, contenaient, au bout de quelques jours, leur amidon inaltéré, fortement colorable en bleu par l'iode. De plus, on voyait facilement, en mettant successivement au foyer les divers plans de l'épaisseur d'une cellule, que les bacilles de l'extérieur n'avaient pas pénétré dans l'intérieur de ce sac clos, qui était intact.

Avec le temps, la gélification et la dissolution de la paroi cellulaire a fait des progrès; des grains d'amidon, de plus en plus nombreux, sont devenus libres dans le liquide et ont présenté à leur tour un commencement de corrosion. Cette corrosion a été très irrégulière, donnant au globule d'amidon, primitivement rond ou ovale, des formes de navet, de gourde à deux renflements, de virgule, etc.; la corrosion irrégulière du pourtour répondait évidemment à l'inégalité de résistance des couches, et l'ensemble du phénomène était plus d'accord avec la théorie qui voit dans le grain d'amidon le résultat de la superposition ou de la juxtaposition de couches successives, qu'avec celle de Nægeli qui y voit une série de sacs emboités. Il semble que dans cette dernière conception, le granule devrait être corrodé régulièrement sur tous les points de sa surface.

Sucres. — Comme l'*A. butylicus*, l'*A. ethylicus* n'intervient pas le sucre de canne avant de le faire fermenter. Il s'arrête aussi assez vite dans son action quand on n'ajoute pas de carbonate de chaux. En présence de la craie, la fermentation est rapide, régulière; le liquide devient très visqueux, coule parfois comme une glaire ou une solution concentrée d'albumine. Il se fait des

quantités assez considérables d'alcool ordinaire qui peuvent dépasser le quart du poids du sucre disparu. Cet alcool est toujours accompagné d'un peu d'aldéhyde. L'acide acétique est ensuite le plus abondant, puis vient l'acide lactique, qui, avec le glucose, est l'acide sarcolactique. Avec l'*A. ethylicus*, cet acide lactique est toujours plus abondant qu'avec l'autre.

Je ne donne pas de chiffres plus précis, parce que les proportions des trois corps sont très variables, les acides produits au début de la fermentation étant détruits vers la fin, comme avec l'*A. butylicus*, et cela qu'ils soient libres ou en combinaison avec la chaux. C'est que ce bacille, que nous venons de voir capable de se développer dans le vide, est aussi un aérobie et peut agir comme comburant, si bien qu'après un long temps, une culture de ce bacille dans du sucre ou de l'amidon peut n'être presque plus acide.

L'acide lactique persiste plus longtemps et est plus abondant avec l'*A. ethylicus* qu'avec l'autre. Peut-être faut-il mettre ce fait en relation avec cet autre que, contrairement à son congénère, l'*A. ethylicus* ne fait pas fermenter le lactate de chaux. Nous sommes en effet conduits à regarder les produits d'une fermentation comme des substances inattaquables ou lentement attaquables par l'être qui les produit. Elles apparaissent alors soit comme produits définitifs, soit comme produits intérimaires, et il est naturel qu'il y ait davantage d'acide lactique produit avec celui de nos deux bacilles qui ne l'attaque pas, ou du moins qui l'attaque moins facilement que l'autre.

Cette propriété de ne pas faire fermenter le lactate de chaux, sépare l'*A. ethylicus* du *Bacillus ethaceticus* de P. Frankland, qui fournit aussi, aux dépens des sucres et de diverses substances hydrocarbonées, de l'alcool et de l'acide acétique. Une nouvelle différenciation résulte de ce que l'*A. ethylicus* donne des spores, et qu'il ne fait pas fermenter la mannite.

Il se distingue d'autre part, par sa forme, de l'*actinobacter polymorphus*, que j'ai décrit autrefois, et qui, aux dépens des sucres, donne de l'alcool et de l'acide acétique. Il se différencie de même du pneumo-bacille étudié par Frankland, et de celui qu'étudie M. Grimbert dans ce même numéro des *Annales*. Ces deux pneumo-bacilles sont en effet si voisins de mon *actinobacter* que rien ne permet encore de les distinguer, sauf leur origine.

Et ici se présente un point sur lequel je voudrais attirer l'attention en terminant.

Voici au moins, étudiés dans ce travail, deux bacilles, difficiles à distinguer l'un de l'autre, ayant la même forme, les mêmes dimensions, sécrétant les mêmes diastases, capables de vivre dans les mêmes milieux d'une façon anaérobie absolue et d'une façon aérobie, donnant des dégagements gazeux d'hydrogène et d'acide carbonique. Partout où l'un d'eux donne de l'alcool ordinaire et de l'acide acétique, l'autre donne de l'alcool butylique et de l'acide butyrique.

Au point de vue de ses propriétés générales, ce dernier a pu être rapproché d'autres bacilles qui lui ressemblent tellement, qu'il faut chercher profondément pour les distinguer. A son tour, l'*A. ethylicus* peut être placé à côté de divers autres bacilles très voisins de lui, et comme lui, producteurs d'alcool et d'acide acétique.

On pourrait sûrement trouver dans la bibliographie d'autres bacilles voisins du premier, et d'autres bacilles analogues au second. On en trouvera plus sûrement encore si on cherche dans le laboratoire. Cette coïncidence qui fait apparaître l'acide acétique là où il y a de l'alcool ordinaire, de l'acide butyrique là où il y a de l'alcool butylique, n'est évidemment pas fortuite, et tient certainement à une propriété profonde du protoplasma, qui, dans la dislocation de l'aliment complexe qu'on lui donne, s'arrête plus volontiers à des chaînes à deux atomes de carbone pour l'*A. ethylicus*, à 4 atomes pour l'*A. butylicus*.

Il est en effet impossible d'expliquer par un phénomène d'oxydation la formation de l'acide au moyen de l'alcool correspondant, car cette production concomitante d'alcool et d'acide se fait en fermentation en présence du vide. Comme l'alcool, l'acide provient de la dislocation de la molécule initiale.

Encore ce mot de dislocation est-il incorrect. On peut à la rigueur admettre que la chaîne d'atomes contenue dans une molécule d'acide butyrique était contenue, au moins en puissance, dans la chaîne plus longue de la molécule de sucre. Mais, comment se donner la même illusion avec l'acide butyrique, chaîne à 4 atomes, provenant de la glycérine qui n'en a que trois. Il faut alors faire intervenir des soudures, c'est-à-dire des synthèses. Mieux vaut se dire que nos conceptions s'appliquent encore mal

à l'étude des actions protoplasmiques, dont je m'efforce de montrer toute la complexité.

Toutes choses égales d'ailleurs, cette production des mêmes corps par des protoplasmas sûrement divers, et cette production de corps différents par des protoplasmas d'êtres que leurs autres propriétés rapprochent, est tout à fait analogue aux procédés de dislocation solaire, dans lesquels la même substance peut, suivant les cas, donner des produits différents, et des substances très variées fournir les mêmes produits. Les circonstances extérieures, dont dépend la nature de la dislocation solaire, sont parfois, en apparence au moins, d'ordre tout à fait secondaire : c'est par exemple le remplacement de la chaux par le baryte ou par la potasse. Si, comme cela est probable, les différences entre les protoplasmas sont du même ordre, on voit de quels détails de structure dépend la vie cellulaire, et la distinction des espèces dans le monde des infiniment petits.

RECHERCHES SUR LE PNEUMOBACILLE DE FRIEDLÄNDER

PAR M. L. GRIMBERT.

(Travail du laboratoire de M. Duclaux, à l'Institut Pasteur.)

PREMIER MÉMOIRE

ÉTUDE DES FERMENTATIONS PROVOQUÉES PAR CET ORGANISME

En 1883, Brieger¹, étudiant l'action du pneumobacille de Friedländer sur des solutions de glucose et de sucre de canne, obtint, comme principal produit de fermentation, de l'acide acétique accompagné d'un peu d'acide formique et d'alcool éthylique ; il en fut de même avec des solutions de lactate de chaux et de créatine. Brieger, dans son Mémoire, se contenta de décrire sommairement ces réactions sans chercher à déterminer les rapports existant entre les divers corps formés.

En 1891, MM. P. Frankland, A. Stanley et W. Frew², reprenant l'étude des fermentations produites par ce même pneumobacille, cherchèrent à établir les équations de ces fermentations par des analyses quantitatives.

Le pneumobacille qui servit à leurs expériences leur avait été fourni en 1886, par l'Institut d'hygiène de Berlin. Depuis ce temps, c'est-à-dire pendant une période de trois ans, il avait été continuellement ensemencé sur gélatine-peptone avant de servir aux fermentations.

Les milieux de culture avaient la composition suivante :

Sucre fermentescible.....	30
Peptone.....	3
Extrait de viande de Liebig.....	2
Carbonate de chaux.....	40
Eau.....	1 000 c. c.

Ensemencés après stérilisation, ils étaient maintenus à l'étuve à 39° pendant un temps qui variait de 6 à 40 jours.

1. *Zeitsch f. phys. Chem.* 8-306 et 9-1.

2. *Journal of chemical society*, t. LIX, p. 233.

De même que Briegeer, P. Frankland et ses élèves trouvèrent, dans les produits de la fermentation du glucose, de l'acide acétique, de l'acide formique et de l'alcool éthylique, d'ailleurs en faible quantité ; c'est ainsi qu'une fermentation d'une durée de 6 jours, rapportée à 100 grammes de glucose, leur donna :

Acide éthylique.....	0,9823
Acide acétique.....	2,4083
Acide formique.....	0,3053
Acide succinique	0,0466

Dans une fermentation de mannite âgée de 36 jours et rapportée également à 100 grammes de substance, ils obtinrent :

Alcool éthylique	6,766
Acides volatils calculés en acide acétique.	5,269

Les acides volatils étaient constitués en grande partie par un acide gras, de poids moléculaire plus élevé que l'acide acétique, probablement par de l'acide propionique.

Les savants anglais étudient ensuite la nature des gaz dégagés pendant la fermentation, ainsi que l'action du bacille sur divers milieux, et arrivent aux conclusions suivantes :

— 1^o Le pneumocoque de Friedländer fait fermenter les solutions de dextrose, saccharose, lactose, maltose, raffinose, dextrine, mannite ;

— 2^o Il ne fait pas fermenter la glycérine ni la dulcite ;

— 3^o Dans les fermentations de dextrose et de mannite, les produits principaux sont l'alcool éthylique et l'acide acétique, avec une petite proportion d'acide formique et des traces d'acide fixe, probablement d'acide succinique ;

— 4^o Les produits gazeux sont : l'hydrogène et l'acide carbonique.

Ayant eu entre les mains un échantillon du pneumobacille de Friedländer provenant du laboratoire de M. Roux, j'ai eu l'occasion de constater qu'il faisait fermenter la glycérine, contrairement à l'opinion de M. P. Frankland. J'ai donc repris entièrement l'étude des propriétés biologiques de cet organisme, et je puis dire déjà que les résultats que j'ai obtenus sont en contradiction avec ceux des auteurs anglais.

En effet :

1^o Non seulement le pneumobacille de Friedländer, de l'Institut Pasteur, fait fermenter la dextrose, le saccharose, le maltose, le lactose, le raffinose, la dextrine et la mannite, mais il attaque énergiquement la glycérine et la dulcite;

2^o Les produits de la fermentation varient avec la nature du sucre employé. Ce sont l'alcool éthylique, l'acide acétique, l'acide lactique gauche et l'acide succinique.

Mais avant d'entrer dans le détail des expériences, nous croyons devoir exposer succinctement la marche générale que nous avons suivie pour déterminer et analyser les produits de nos fermentations.

Nous commencerons d'abord par décrire le pneumobacille que nous avons employé ; nous parlerons ensuite de la composition de nos milieux de culture et de leur mode d'ensemencement.

MORPHOLOGIE ET CARACTÈRES BIOLOGIQUES DU PNEUMOBACILLE DE FRIEGLANDER

Le bacille de Friedländer qui nous a été remis par M. Roux présentait les caractères suivants :

1^o Au microscope : petits bacilles très courts souvent réunis par deux, entourés d'une auréole très nette même dans les cultures sur gélose et sur bouillon. Ne se colorant pas par la méthode de Gram. Nous n'avons jamais observé dans nos cultures les formes décrites par certains auteurs : « gros filaments enchevêtrés, un peu plus gros que les filaments charbonneux, non segmentés, à côté desquels se voient de gros bâtonnets plus ou moins longs » ;

2^o Sur gélose : trace épaisse et visqueuse.

3^o Sur pommes de terre : trace blanchâtre, épaisse et crémeuse, avec ça et là quelques bulles de gaz ;

4^o Sur gélatine en plaques : colonies rondes devenant opaques, blanches et surélevées, en forme de bouton très saillant. La gélatine n'est pas liquéfiée ;

5^o Sur gélatine en piqûre : culture dite en forme de clou ;

6^o Sur peptone (solution de peptone à 3 0/0, neutralisée), pas d'indol, même au bout d'un mois.

4. WURTZ, *Précis de bactériologie clinique*. (G. Masson, éditeur, 1895.)

7^o Sur peptone nitrée (formule de M. Metchnikoff) : transformation des nitrates en nitrites ;

8^o Sur le lait : coagulation lente.

Le pneumobacille de Friedländer est un anaérobiose facultatif.

Il fait fermenter les substances suivantes : glucose, galactose, arabinose, mannite, dulcite, glycérine, saccharose, lactose, maltose, raffinose, dextrine, pommes de terre.

Il est sans action sur l'érythrite.

MÉTHODES DE CULTURE

Nos milieux de culture avaient tous la composition suivante :

Sucre fermentescible	3
Peptone sèche	2
Eau	100
Carbonate de chaux	Q. S.

Nous avons démontré dans un travail antérieur¹ qu'il était souvent illusoire de vouloir établir la formule unique et simple d'une fermentation : aussi nous sommes-nous surtout attaché à déterminer les rapports existants entre les divers corps formés, sans chercher à les relier par une équation au sucre générateur.

Afin d'éviter toute influence résultant de l'âge ou de l'éducation de la semence, nous avons toujours opéré de la manière suivante dans l'ensemencement de nos milieux :

Une première culture sur plaque de gélatine nous ayant démontré la pureté de notre culture, une colonie prélevée servait à ensemencer un tube de bouillon simple, lequel à son tour servait à préparer quelques tubes de gélose. Une trace de cette dernière culture était portée au moment du besoin dans un tube de bouillon simple et, 24 heures après, quelques gouttes de ce dernier servaient à ensemencer le ballon d'expérience.

Nous avons opéré généralement sur 500 à 600 c. c. de solution, renfermés dans un ballon d'une contenance voisine d'un litre, de manière à ce que la solution sucrée offrit une large surface au contact de l'air. Après addition de carbonate de chaux pur, le

1. L. GRIMBERT, Fermentation anaérobiose produite par le *B. orthobutylicus*. (*Annales de l'Institut Pasteur*, VII, p. 353.)

ballon était fermé par un tampon de coton et stérilisé à l'autoclave à 120° pendant un quart d'heure environ.

Après refroidissement, le ballon était ensemencé, puis porté à l'étuve à 36°.

Le lendemain, la fermentation était active et se traduisait par un abondant dégagement de gaz.

MARCHE GÉNÉRALE DE L'ANALYSE DES PRODUITS
DE LA FERMENTATION

Pour déterminer qualitativement et quantitativement les produits de la fermentation, nous avons suivi la marche générale que nous avons déjà décrite dans ces *Annales* à propos des fermentations produites par le *Bacillus orthobutylicus*¹. Nous la résumerons en quelques mots :

Le liquide est filtré au papier. Une petite portion mise à part sert à examiner la réaction du milieu, la réduction exercée sur la liqueur cupropotassique et à effectuer le dosage de la chaux en solution.

Un volume déterminé de l'autre portion est distillé pour recueillir l'alcool formé.

En général, nous avons opéré sur 400 c. c. Dans une première distillation, nous recueillions 100 c. c. d'un liquide qui offrait toujours une réaction légèrement alcaline. Ces 100 premiers c. c., additionnés d'une trace d'acide tartrique pour neutraliser l'alcalinité, étaient distillés de nouveau, et on recueillait 50 c. c. Cette dernière portion était soumise à l'épreuve du compte-gouttes, d'après la méthode de M. Duclaux², de l'alcoomètre et de la réaction de l'iodoforme.

Aux 300 c. c., résidu de la distillation, on ajoutait 100 c. c. d'une solution d'acide oxalique, de manière à rétablir le volume primitif et à mettre les acides en liberté en précipitant la chaux.

On prélevait alors 110 c. c. du liquide filtré pour les soumettre aux distillations fractionnées, d'après la méthode de M. Duclaux³, dans le but de déterminer la nature et la proportion des acides volatils.

1. L. GRIMBERT, *loc. cit.*

2. Ces *Annales*, avril 1895.

3. Ces *Annales*, juillet 1895.

Le reste était évaporé à consistance sirupeuse, puis agité avec de l'éther.

L'éther distillé laissait un résidu tantôt sirupeux, tantôt cristallisé, tantôt offrant un mélange de cristaux dans un liquide sirupeux.

Dans le cas d'un liquide sirupeux, il nous fut facile de nous assurer que nous étions en présence d'acide lactique *gauche*, donnant des sels de zinc déviant *à droite* le plan de la lumière polarisée.

Les cristaux étaient formés par de l'acide succinique, caractérisé par son point de fusion (180°), par sa sublimation et par l'action de son sel de soude sur le perchlorure de fer.

Dans le troisième cas, il s'agissait d'un mélange d'acide lactique et d'acide succinique.

CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Nous choisirons comme exemple de fermentation une fermentation de mannite âgée de 38 jours, parce que nous y rencontrerons à la fois de l'alcool et de l'acide lactique, et que nous pourrons en comparer les résultats avec ceux donnés par Frankland pour une fermentation analogue.

Une solution de mannite pure à 3 0/0 faite dans les conditions décrites plus haut estensemencée le 25 mai 1895 et examinée le 2 juillet, soit 38 jours après.

— Réaction : le liquide offre une réaction alcaline. Il ne réduit pas la liqueur cupropotassique.

— Dosage de la chaux : 10 c. c. sont traités à l'ébullition par un léger excès d'oxalate d'ammoniaque. Le lendemain, l'oxalate de chaux recueilli est transformé en chaux vive que l'on pèse. Pois de CaO : 0,049, soit pour 100 c. c. : 0,490.

— Dosage de l'alcool : 350 c. c. sont distillés comme il a été dit plus haut, de manière à recueillir 50 c. c.

Le liquide distillé donne la réaction de l'iodoforme : à l'alcoomètre, il marque $3^{\circ},5$ à 19° , soit $3^{\circ},1$ à 15° ; au compte-gouttes, il donne 120 gouttes à 21° , soit 3° à 15° .

La concordance est donc parfaite. L'alcool obtenu est bien de l'alcool éthylique. Les 3 0/0 en volume représentent en poids ($3 \times 0,8$) 2^{gr},40 0/0. C'est le titre des 50 c. c. distillés, par con-

séquent ces 50 c. c. renferment 1^{er}, 200 d'alcool fourni par la distillation de 350 c. c. de la liqueur primitive. 100 c. c. de celle-ci renferment donc $1,20 : 350 = 0,342$ d'alcool éthylique.

Dosage des acides volatils. — La liqueur primitive débarrassée de l'alcool par distillation est ramenée au volume primitif par addition d'une solution d'acide oxalique. 110 c. c. du liquide filtré, dans lequel les acides sont en liberté, sont distillés d'après la méthode de M. Duclaux. Nous résumerons dans le tableau suivant les résultats obtenus :

	α	β	A	Théorie pour $C_2H^4O^2$
1	8,8	8,8	7,6	7,4
2	9,2	18,0	15,6	15,2
3	9,6	27,6	24,0	23,4
4	9,9	37,5	32,6	32,0
5	10,3	47,8	41,6	40,9
6	11,	58,8	51,2	50,5
7	11,5	70,3	61,2	60,9
8	12,8	83,1	72,3	71,9
9	14,4	97,5	84,9	84,4
10	17,3	114,8	100,0	100,0

Dans ce tableau nous rappellerons que la colonne α représente pour chaque prise le nombre de centimètres cubes d'eau de chaux nécessaires pour saturer l'acide passé à la distillation.

La colonne β donne le total de l'eau de chaux employée dans les 1, 2, 3... 8, 9, 10 premières prises.

La colonne A contient le rapport, à la quantité d'acide passée à la distillation, des quantités d'acide passées dans les 10, 20, 30, 40, etc., etc., premiers centimètres cubes.

Enfin, la dernière colonne contient les mêmes rapports déterminés pour l'acide acétique. Comme on le voit, l'accord entre les chiffres de cette dernière colonne et les chiffres correspondant de la colonne A est aussi parfait que possible. Il faut donc en tirer cette conclusion que l'acide volatile formé dans la fermentation de la mannite est l'acide acétique seul sans mélange d'autres acides volatils.

Or, nous voyons par l'inspection de la colonne β qu'il nous a fallu 114,8 c. c. d'eau de chaux pour saturer les 100 c. c. d'acide acétique passés à la distillation.

D'après le titre de notre eau de chaux, ces 114,8 c. c. correspondent à 0,280 d'acide acétique et, M. Duclaux ayant démontré que la quantité d'acide acétique qui passe ainsi à la distil-

lation est égale aux 80 centièmes de la quantité totale contenue dans les 110 c. c. introduits dans le vase à distiller, une simple proportion nous donnera la quantité réelle d'acide renfermée dans la liqueur primitive : on trouve ainsi que 100 c. c. de la liqueur primitive renferment 0,318 d'acide acétique.

Dosage des acides fixes. — Le reste du liquide traité comme nous l'avons dit dans la marche générale, l'éther laisse un résidu sirupeux très acide dont la solution aqueuse dévie à gauche le plan de la lumière polarisée. On le transforme en sel de zinc. Celui-ci cristallise facilement. Une solution renfermant 6^o,73 de sel sec pour 100 c. c. d'eau donne au polarimètre de Laurent une déviation à droite de + 0^o,44' = 0^o,733 pour un tube de 2 décimètres.

$$[\alpha] \ddot{\times} = \frac{0,733 \times 100}{2 \times 6,73} = + 5^{\circ},44$$

Le pneumobacille de Friedländer a donc transformé la mannite en alcool éthylique, acide acétique et acide lactique gauche.

Nous venons de voir que la quantité de chaux entrée en solution était de 0,490 par 100 c. c. Les 0,318 d'acide acétique représentent 0,418 d'acétate de chaux, soit 0,148 de chaux CaO.

La différence 0,490 — 0,148 = 0,342 représentera la chaux du lactate de chaux formé et ce chiffre correspond à 1,099 d'acide lactique.

Nous voyons donc que 3 grammes de mannite en solution dans 100 c. c. de liquide ont donné au bout de 38 jours :

Alcool éthylique.....	0,312
Acide acétique.....	0,318
Acide lactique gauche.....	1,099

Reportons ces chiffres à 100 grammes de mannite et comparons les à ceux obtenus par Frankland :

Durée de la fermentation.	38 jours.	36 jours.	(Frankland)
Alcool éthylique.....	11,40	6,766	
Acide acétique.....	10,60	5,269	
Acide lactique gauche.....	36,63	0,000	
	58,63	12,035	

FERMENTATIONS DIVERSES

La même marche ayant été suivie pour l'examen des autres fermentations, nous nous contenterons d'en énumérer ici les résultats :

I. *Glucose*. — La fermentation dure un mois. Réaction alcaline, pas de réduction de la liqueur de Fehling. Tout le sucre a été consommé.

100 grammes de glucose ont donné :

Alcool éthylique.....	Traces
Acide acétique.....	14,06
Acide lactique gauche.....	58,49

Le lactate de zinc en solution à 8,99 0/0 a un pouvoir rotatoire de

$$[\alpha]_d = + 5^{\circ},84$$

II. *Galactose*. — Durée de la fermentation : 10 jours. Réaction alcaline. Traces de réduction. 100 grammes de galactose ont donné :

Alcool éthylique.....	7,66
Acide acétique.....	16,60
Acide lactique gauche.....	53,33
	77,59

Le lactate de zinc a un pouvoir rotatoire de

$$[\alpha]_d = + 5^{\circ},04$$

pour une concentration de 9,92 0/0.

III. *Arabinose*. — Durée de la fermentation : 69 jours. Réaction alcaline, pas de réduction.

Il n'y a pas trace d'alcool.

100 grammes d'arabinose donnent :

Alcool éthylique.....	0,00
Acide acétique.....	36,13
Acide lactique gauche.....	49,93
	86,06

IV. *Glycérine*. — La fermentation est examinée au bout d'un mois. Réaction alcaline. Pas de réduction. Si l'on suppose que toute la glycérine a été consommée, nous trouvons pour 100 grammes :

Alcool éthylique.....	10,00
Acide acétique.....	11,82
Acide lactique gauche	27,32
	<u>49,14</u>

Le lactate de zinc pour une concentration de 5,45 0/0 donne un pouvoir rotatoire de

$$[\alpha]_d = +5^{\circ}82$$

V. *Mannite*. — Nous venons de voir que 100 grammes de mannite donnent au bout de 38 jours :

Alcool éthylique.....	11,40
Acide acétique.....	10,60
Acide lactique gauche.....	36,63
	<u>58,63</u>

et que le pouvoir rotatoire de lactate de zinc en solution à 6,73 0/0 était de : $[\alpha]_d = +5^{\circ}44$. Il est intéressant de rapprocher ces données de celles fournies par la fermentation de la dulcite, son isomère.

VI. *Dulcite*. — Comme la mannite, la dulcite donne de l'alcool éthylique et de l'acide acétique ; mais, au lieu de donner de l'acide lactique gauche, elle donne de l'acide succinique. Notons en passant que, d'après Frankland, la dulcite, de même que la glycérine, résiste à l'action du pneumocoque de Friedländer. Nous avons trouvé pour 100 grammes de dulcite :

Alcool éthylique.....	29,33
Acide acétique.....	9,46
Acide succinique.....	24,63
	<u>60,42</u>

VII. *Saccharose*. — Durée de la fermentation : 2 mois. Tout le sucre est consommé. Un essai spécial nous a démontré que le saccharose n'est pas interverti dans le cours de la fermentation.

Celle-ci ne nous donne que des traces d'alcool éthylique, de l'acide acétique, et un mélange d'acide lactique gauche et d'acide succinique, dans lequel domine l'acide lactique. En présence de trois acides, les données nous manquent pour établir exactement le poids des acides lactique et succinique. Nous nous contenterons d'en signaler l'existence et d'en exprimer le poids en acide lactique. Quant à l'acide acétique, il a été dosé par les méthodes que nous avons décrites.

Dans ces conditions, nous trouvons pour 100 grammes de saccharose consommé :

Alcool éthylique.....	Traces
Acide acétique.....	29,53
Acide lactique gauche.....	43,60 Calculé en acide lactique.
Acide succinique.....	

Le lactate de zinc a pu être préparé. Son pouvoir rotatoire pour une concentration de 1^{gr},345 0/0 est de :

$$[\alpha]_d = +5^{\circ},3.$$

VIII. *Lactose*. — Dans la fermentation du lactose, nous trouverons encore un mélange d'acide succinique et d'acide lactique. Mais ici c'est l'acide succinique qui domine. L'acide lactique n'existe qu'en très faible quantité. C'est encore de l'acide gauche. Nous avons fait 3 expériences de fermentation que nous désignerons par les lettres A, B, C. — Dans les deux premières, A et B, le lactose se trouvait en solution avec 2 0/0 de peptone comme les autres sucres; dans la 3^e nous avons réduit la proportion de peptone à 0,25 0/0 en même temps que nous avons remplacé l'eau distillée par le liquide salin qui nous a servi à la culture du *B. orthobutylicus*¹. Nous allons résumer les résultats obtenus dans le tableau suivant :

Durée de la fermentation.	A 24 jours.	B 13 jours.	C 16 jours.
Alcool éthylique.....	16,66	15,00	13,33
Acide acétique.....	30,66	19,53	21,36
Acide succinique.....	26,76	30,73	23,46
Acide lactique gauche.....	traces	traces	traces

L'influence de la quantité de peptone peut donc être considérée ici comme à peu près nulle.

IX. *Maltose*. — Durée de la fermentation : 68 jours. Pas de réduction. On n'obtient que des traces d'alcool éthylique, et, en dehors de l'acide acétique, un mélange d'acide succinique et d'acide lactique.

100 grammes de maltose ont donné :

Alcool éthylique.....	Traces
Acide acétique.....	35,53
Acide lactique	+
Acide succinique.....	+

X. *Dextrine*. — Fermentation de 12 jours. La transformation

1. L. GRIMBERT, *loc. cit.*, p. 359.

est incomplète. L'iode donne encore une coloration pourpre à la liqueur.

Le dosage de l'alcool montre qu'on se trouve en présence d'un mélange d'alcool éthylique avec un autre alcool supérieur. Car, tandis que le liquide distillé marque 0°,5 à l'alcoomètre, le compte-gouttes accuse 3°, mais la petite quantité dont on dispose ne permet pas de déterminer la nature du mélange.

La dextrine ne nous a donné, comme acide fixe, que de l'acide succinique sans traces d'acide lactique.

100 grammes de dextrine au bout de 12 jours ont donné :

Alcool.....	?
Acide acétique.....	10,43
Acide succinique.....	13,96

XI. Pommes de terre. — L'action du pneumobacille de Friedländer sur l'empois d'amidon méritant une étude spéciale que nous réservons pour un prochain mémoire, nous nous sommes contentés d'examiner l'action de celui-ci sur des tranches de pommes de terre.

Ces dernières étaient placées en même temps que du carbonate de chaux dans un ballon rempli aux deux tiers d'eau ; le tout était stérilisé à l'autoclave à 120° pendant trois quarts d'heure, de manière à obtenir en même temps la cuisson des pommes de terre. Après refroidissement, le ballon étaitensemencé à la manière ordinaire. La fermentation était bientôt active. Examinée au bout de 2 mois, elle nous a donné le résultat qualitatif suivant :

Alcool.....	0
Acide volatil.....	exclusivement formé d'acide acétique.
Acide fixe.....	exclusivement formé d'acide succinique.

Les cellules de la pomme de terre ne renfermaient plus d'amidon colorable en bleu par l'iode, mais de l'amylo-cellulose, capable de se transformer en amidon soluble quand on la chauffe vers 100° en présence de l'eau.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1° Les produits de la fermentation provoquée par le pneumobacille de Friedländer sont : 1° l'alcool éthylique ; 2° l'acide acétique ; 3° l'acide lactique gauche ; 4° l'acide succinique ;

2^o Mais, tandis que la glucose, la galactose, l'arabinose, la mannite et la glycérine donnent de l'acide lactique gauche à l'exclusion de l'acide succinique, le saccharose, le lactose et le maltose donnent à la fois de l'acide succinique et de l'acide lactique gauche, et la dulcite, la dextrine et les pommes de terre ne produisent que de l'acide succinique sans traces d'acide lactique ;

3^o L'acide acétique a été rencontré dans toutes les fermentations à l'état pur, sans mélange d'acide formique ni d'acide propionique ;

4^o L'alcool éthylique, moins abondant que les autres corps formés, fait quelquefois défaut comme dans les fermentations de pommes de terre ou d'arabinose, ou bien n'existe qu'à l'état de traces dans les fermentations de glucose, de saccharose ou de maltose.

Dans les fermentations de dextrine, il est mélangé à une petite quantité d'alcools supérieurs ;

5^o Nous insisterons particulièrement sur les produits de la fermentation de la mannite et de la dulcite.

Le premier de ces deux isomères fournit de l'acide lactique gauche, tandis que la dulcite ne donne que de l'acide succinique.

Nous avons donc devant les yeux l'exemple rare d'un ferment donnant des produits variables avec la nature du sucre qu'il détruit.

Nous pensons qu'il serait prématuré de chercher à établir un rapprochement quelconque entre la fonction chimique ou la formule de constitution des hydrates de carbone employés dans nos recherches et les produits de leur fermentation ; toutefois nous ne pouvons nous empêcher de faire remarquer que l'acide lactique gauche a été fourni exclusivement par les hydrates de carbone possédant une fonction alcool (à l'exception de la dulcite), quel que soit le nombre de leurs atomes de carbone ; que les sucres en C¹², les bioses de Scheibler, ont donné un mélange d'acide lactique et d'acide succinique, et que les hydrates de carbone d'un poids moléculaire élevé, amidon, dextrine, ont donné seulement de l'acide succinique.

De plus, si nous comparons nos résultats avec ceux des auteurs anglais, nous voyons que, tandis que le pneumocoque étudié par Frankland et ses élèves ne donne que de l'alcool

éthylique et de l'acide acétique, avec des traces d'acide formique et d'acide supérieur, et encore en faible quantité, celui que nous avons eu entre les mains donne des quantités relativement considérables d'acide succinique ou d'acide lactique gauche suivant les circonstances.

Tandis que le microbe de Frankland ne fait fermenter ni la glycérine, ni la dulcite, le nôtre les attaque avec énergie.

Il faut donc en conclure qu'il existe au moins deux pneumobacilles de Friedländer, morphologiquement semblables, mais différant profondément entre eux par leurs actions fermentatives, à moins que la longue série de cultures sur gélatine-peptone (pendant 3 ans) subies par le pneumobacille dans le laboratoire de Frankland ait réussi à modifier ses propriétés en créant une race nouvelle.

Quoi qu'il en soit, dorénavant, chaque fois que l'on rencontrera une bactérie présentant tous les caractères du pneumobacille de Friedländer, il faudra vérifier son action sur la glycérine afin de l'identifier soit avec l'organisme de Frankland, soit avec celui que nous avons étudié.

Le schéma suivant résume l'ensemble de mes résultats.

	Alcool.	Ac. acétique.	Ac. lactique.	Ac. succinique.
Glucose.....	Traces	+	+	0
Galactose.....	+	+	+	0
Arabinose.....	0	+	+	0
Mannite.....	+	+	+	0
Glycérine.....	+	+	+	0
Saccharose.....	Traces	+	+	+
Maltose.....	Traces	+	+	+
Lactose.....	+	+	Traces	+
Dulcite.....	+	+	0	+
Dextrine.....	+	+	0	+
Pommes de terre.....	0	+	0	+

REVUES ET ANALYSES

SUR L'ÉLECTION DES ALIMENTS ORGANIQUES

PAR W. PFEFFER

REVUE CRITIQUE

Il serait évidemment très commode de pouvoir établir au laboratoire la valeur d'une matière alimentaire, en cherchant simplement ce qu'elle contient d'azote, d'hydrogène, d'oxygène et de carbone, et d'établir ainsi une classification indépendante du jugement plus ou moins motivé que portent sur leurs aliments les hommes, les animaux et les végétaux. Cela a été tenté : cette classification existe dans les livres. Elle n'est pourtant pas encore à ma connaissance passée dans les faits, et je ne sache pas que le chimiste le plus convaincu de sa vérité ait commencé à se nourrir de coton-poudre, de nitro-glycérine ou de tablettes de celluloïd, sous prétexte que ces diverses substances contiennent toutes de l'azote, du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène comme un aliment complet. Tout chimiste réserve son goût et ses besoins ; mais alors il devrait bien réserver ceux des autres.

J'ai essayé de réagir contre cette conception trop simpliste du mot aliment dans une note présentée en 1885 à la Société de biologie, et développée plus tard dans ces *Annales*¹. Après beaucoup d'autres savants, M. W. Pfeffer vient de revenir sur ce champ de recherches, inauguré, pour les études sur les microbes, par les travaux de Dubrunfaut sur les levures et par les découvertes de M. Pasteur, relatives aux pouvoirs nutritifs différents des deux tartrates d'ammoniaque. Seulement, il ne semble pas que le procédé opératoire auquel il s'est arrêté soit le meilleur à employer pour la solution du problème.

Il opère en composant un peu au hasard un milieu nutritif de sels minéraux dans lequel il introduit la substance dont

1. Société de biologie, t. XXXVII, p. 91, et ces *Annales*, t. III, p. 97, 1888.

il veut mesurer la valeur alimentaire. Mais il sème une levure ou une mucédinée. Il peut arriver alors que la plante ne pousse pas, sans qu'on puisse en conclure que l'aliment offert est défavorable : il suffit que l'aliment minéral le soit. Les difficultés de vivre, provenant de ce chef, sont alors difficiles à distinguer de celles qui viennent du côté de l'aliment organique.

Puisque M. Pfeffer a fait servir à ces études *l'aspergillus niger*, dont l'alimentation minérale est bien connue, grâce à M. Raulin, il eût été préférable, au moins pour cette mucédinée, de se servir du liquide nutritif composé par ce savant, dont l'admirable travail ne réussit pas, je ne sais pourquoi, à prendre pied en Allemagne.

De plus, autant qu'on peut le voir dans le travail de M. Pfeffer, très sobre de détails sur les points les plus essentiels de sa recherche, on n'a nulle part tenté de séparer l'effet que peut avoir une matière alimentaire sur la croissance d'une plante, de celui qu'elle exerce sur la plante adulte et en pleine possession de tous ses moyens d'action. J'avais pourtant montré, dans le travail visé plus haut, que cette distinction est essentielle, et que tel aliment, incapable de servir à la construction des tissus de *l'aspergillus*, les entretient en bon état et leur permet même d'augmenter de poids lorsqu'on le leur offre quand ils sont bien développés. M. Pfeffer laisse ces deux effets confondus et, par là, il introduit une nouvelle cause d'inégalité et d'incertitude dans ses résultats, car un aliment qui nourrit mal ne fournit pas, au bout du même temps, un poids de végétal aussi considérable qu'un aliment qui nourrit bien, de sorte qu'en comparant les effets produits au bout du même temps, on trouve superposés les effets de la qualité de l'aliment et de la quantité de la récolte. On eût évité cette superposition en prenant deux cuvettes égales, contenant des poids égaux de végétal, et en soumettant à son action des liquides contenant le même poids des aliments à comparer. C'est un petit problème que le travail de M. Raulin permet de résoudre sans aucune difficulté. Mais il faut consentir à le prendre pour guide.

La méthode de M. Pfeffer est tout autre. Dans un même liquide, il introduit deux aliments hydrocarbonés et azotés, en prenant l'un parmi les bons, l'autre parmi les mauvais ou les médiocres. Sur ce milieu, contenu dans des matras à fond plat, maintenus à l'obscurité, à l'étuve ou à la température ordinaire,

il sème la plante à consulter, et, au bout de quelques jours ou de quelques semaines suivant les cas, il cherche par l'analyse ce qu'il reste des deux aliments introduits. Les combinaisons qu'il a étudiées paraissent avoir été multiples, mais il ne donne ses résultats que pour les suivantes : dextrose mélangée à de la glycérine, ou à de l'acide acétique, ou à de l'acide lactique ; peptone mélangée à la dextrose et à la glycérine ; enfin, combinaison d'acide tartrique droit et d'acide tartrique gauche, telle qu'on la trouve dans l'acide racémique. Cette dernière étude nous entraîne sur le terrain de l'influence des pouvoirs rotatoires. Nous la retrouverons tout à l'heure ; occupons-nous d'abord des premiers mélanges.

Le résultat le plus intéressant est la compensation qui s'établit entre la mauvaise qualité d'un aliment et sa quantité. Voici, par exemple, en présence de *l'aspergillus niger*, de la dextrose, aliment excellent, et de la glycérine, aliment bon encore, mais plus médiocre. La plante préfère naturellement le premier, mais quand elle en a peu, elle consent à attaquer le second. En présence de 8 0/0 de dextrose, on trouve intacts les 0,92 0/0 de glycérine introduits dans le liquide. En présence de 4 0/0 de dextrose, il y a un peu de glycérine détruite quand on en a mis 1,96 0/0. Il faut remarquer, pour bien comprendre la portée de l'expérience, que, lorsqu'on l'a interrompue dans les deux cas, il y avait encore de la dextrose non consommée, de sorte que dans le second cas, si la plante a touché à la glycérine, ce n'est pas par famine¹.

En augmentant la proportion de glycérine et en diminuant celle du sucre, on n'empêche pourtant pas celui-ci d'être préféré, et il semble que ce soit seulement après qu'il n'y en a plus que la consommation de la glycérine commence d'une façon active. L'utilisation économique de cette substance est d'ailleurs inférieure à celle du sucre, c'est-à-dire que le poids de récolte est moins grand avec la glycérine pour un même poids d'aliment consommé.

1. Cette circonstance de la famine m'empêche de suivre M. Pfeffer dans la comparaison qu'il fait (p. 216) de la consommation de la glycérine dans deux expériences (6 et 9), dans l'une desquelles il restait du sucre au moment de l'étude, tandis que l'autre n'en contenait plus. Il est clair que les conditions de vie de la plante avaient changé de ce fait, depuis un temps inconnu, et que les résultats ne sont plus comparables.

Toutefois le *penicillium glaucum* se comporte à ce sujet un peu autrement que l'*aspergillus*, et fait moins de différence entre la glycérine et le sucre que son congénère.

On trouve des conclusions du même ordre, en comparant, d'un côté, la peptone à la glycérine, et de l'autre la peptone à la dextrose. En présence de la peptone, la glycérine est à peine attaquée, si elle l'est, par l'*aspergillus*. Elle l'est un peu plus par le *penicillium*. L'*aspergillus* attaque au contraire vivement la dextrose, même en présence de peptone.

L'acide lactique se tient, pour ces deux végétaux microscopiques, à peu près au même niveau que la glycérine. En revanche, l'acide acétique est consommé en quantités considérables, même en présence de sucre. C'est ce que j'avais déjà vu. Cette notion semble inexplicable à M. Pfesser, qui table sur ce que l'acide acétique est un des corps les moins facilement oxydables de la chimie végétale. Mais en fait d'actions protoplasmiques, le mot oxydable n'a aucun sens. L'alcool n'est pas oxydable par le protoplasma de la levure, il l'est par celui du mycoderme du vinaigre. L'acide acétique est tantôt oxydable et tantôt inoxydable par ce même mycoderme, comme l'a montré Pasteur dans les expériences sur l'acétification qui sont la préface de toutes nos recherches sur le sujet.

C'est aussi lui, comme je l'ai rappelé plus haut, qui a ouvert avec Dubrunfaut la porte aux études sur l'intervention du pouvoir rotatoire, par ses recherches sur l'utilisation alimentaire des tartrates. Dans une solution de racémate d'ammoniaque envahie par des bactéries, il a vu que le tartrate droit était seul atteint, et qu'en étudiant le liquide lorsqu'il s'était éclairci, on n'y trouvait que du tartrate gauche.

On sait les développements que cette notion fondamentale a pris depuis. M. Le Bel, en utilisant l'action de moisissures, est arrivé de même à dédoubler des alcools secondaires inactifs et à obtenir l'alcool amylique secondaire gauche, l'alcool butylique secondaire gauche, et, tout récemment, avec M. Combes, le méthylbutylcarbinol lévogyre¹. Le glycol propylénique inactif lui a de même fourni un composant actif². Enfin il a réussi à rendre de nouveau actif un alcool amylique transformé

1. *Bull. Soc. chim.*, t. XXXIII, p. 106, et *Comptes rendus*, t. LXXXIX, p. 412.

2. *Bull. Soc. chim.*, t. XXXIV, p. 429, et *Comptes rendus*, t. XCII, p. 532.

en un mélange de droit et de gauche, et par là rendu inactif. Seulement, c'est alors de l'alcool droit qu'on obtient, tandis que la nature fournit l'alcool gauche¹.

M. Bremer² a montré de son côté que tous les acides maliques inactifs sont dédoublables. M. Lewkowitsch³ a dédoublé les acides lactique, glycérique et phénylglycolique ou amygdalique; Purdie et Walker, l'acide éthoxysuccinique par le *penicillium glaucum*, et Schulze et Bosshard ont produit, avec le même champignon, une leucine active aux dépens de la leucine inactive. L'acide lactique a été de même dédoublé par Linossier avec le *penicillium*, par Pétré⁴ avec le *B. coli commune* et le *B. typhi*, par Frankland⁵ avec d'autres bactéries.

Je laisse de côté quelques exemples moins nets de production de corps actifs dans la série pyridique ou aromatique, de même que, dans les corps azotés pentatomiques. Je me borne à remarquer que, dans la plupart des exemples que j'ai cités, les cultures qui ont fourni les corps actifs et présidé au dédoublement étaient pauvres et en souffrance. On a donc le droit de penser qu'il y avait là un cas de sélection alimentaire. Placées dans un mauvais milieu, elle vont naturellement à l'aliment qui leur convient le mieux et délaisse l'autre.

Les expériences de M. Pfeffer ne nous font pas sortir complètement de ces conditions, car, bien qu'il n'indique pas les poids de récolte qu'il a obtenus, et qu'il reste sur ce point, de même que sur bien d'autres, aussi sobre de renseignements que les savants qui l'ont précédé, on voit pourtant que, chez lui comme chez eux, il a fallu des semaines et des mois pour transformer de petites quantités de racémates.

Voici ses résultats.

L'acide tartrique droit est consommé de préférence et le premier par l'*aspergillus niger*, le *penicillium glaucum*, l'*aspergillus flavescens*, la *monilia candida*, une levure qu'il appelle *spaltende Hefe*, analogue, mais non identique au *saccharomyces ellipsoïdeus* de Hansen, et une bactérie *rechts bacterium*, trouvée dans une putréfaction de tartrate de chaux. Toutefois, ces espèces atta-

1. *Bull. Soc. chim.*, t. XXXI, p. 104, et *Comptes rendus*, t. LXXXVII, p. 213.

2. *Berichte d. d. chem. Gesell.*, t. XIII, p. 351.

3. *Ibidem*, t. XVI, p. 1568.

4. Ces *Annales*, 1802.

5. *Centralbl. f. Bakt.*, 1894, t. XV, p. 106.

quent aussi, bien qu'en plus faibles proportions, l'acide gauche.

Les deux acides sont détruits en même temps et en mêmes proportions par *l'aspergillus fumigatus*, la *mortierella reticulata*, le *saccharomyces ellipsoïdeus*, la levure rose, la levure de Duclaux, faisant fermenter le sucre de lait, et le *bacillus subtilis*.

L'acide tartrique gauche est en revanche consommé de préférence par une bactérie, *links bacterium*, qui s'était développée spontanément au laboratoire dans une solution de tartrate gauche de soude et d'ammoniaque. Pourtant cette bactérie consomme aussi, mais plus faiblement, le tartrate droit. Lewkowitsch avait de même signalé une bactérie qui attaque de préférence le tartrate gauche, tout en détruisant de préférence aussi l'amygdalate droit.

On connaissait déjà des exemples pareils pour les levures. Dans le sucre interverti, on sait par Dubrunfaut que le d-glucose, qui contient un chaînon aldéhydique, fermente plus facilement que le d-fructose, dont le chaînon correspondant est cétonique. Gayon et Dubourg¹, qui ont confirmé le fait pour les levures ordinaires, ont trouvé des levures qui font l'inverse.

A côté de ces résultats expérimentaux, il y a dans le travail de M. W. Pfeffer des considérations théoriques qu'il serait trop long de résumer, et que je remplacerai par les suivantes, ayant la même valeur comme hypothèse, et une autre direction. Elles sont relatives uniquement au mode de formation et de destruction des substances ayant la même constitution et le même rôle chimique, mais différentes par le pouvoir rotatoire. Nous venons de voir la dextrose et la lévulose, les acides tartriques droit et gauche, les acides lactique droit et gauche être consommés de façon fort inégale par les microbes qui s'implantent dans leurs solutions. Il est évident que les protoplastes, envisagés dans leur ensemble, tiennent compte des différences de constitution atomique qui se traduisent par des différences dans le pouvoir rotatoire, et il est évident aussi qu'en face de ce fait, nous pouvons placer cet autre fait, non moins important, que beaucoup de produits organiques naturels sont doués du pouvoir rotatoire, ce qui revient à dire que certaines cellules fabriquent le corps droit sans produire le gauche ou inversement.

Voici par exemple les cellules du raisin qui fournissent

1. *Comptes rendus*, 1890, t. CX, p. 865.

d'ordinaire de l'acide tartrique droit, sans mélange appréciable d'acide tartrique gauche. Comment comprendre ce fait ? Faut-il croire que la cellule du grain de raisin, qui procède à une synthèse en partant de l'eau et de l'acide carbonique, fabrique à la fois l'acide tartrique droit et l'acide tartrique gauche, en quantités équivalentes, comme le ferait un chimiste travaillant dans son laboratoire, puis qu'elle consomme le second en gardant le premier comme aliment de réserve ? Faut-il croire au contraire qu'elle ne fabrique que le second ?

Cette dernière hypothèse est d'accord avec ce que nous savons, depuis M. Pasteur, au sujet des influences qui peuvent créer des corps de pouvoirs rotatoires inverses. Tant qu'on ne met en jeu que des influences *symétriques*, le corps droit est formé comme le corps gauche, aux dépens des produits inactifs mis en jeu. Mais si l'influence qui intervient est dissymétrique, l'un des deux corps peut ne pas se former. Or les protoplasmas vivants sont doués en général du pouvoir rotatoire, et par là sont dissymétriques. On peut donc admettre, en restant d'accord avec ce que nous savons, que le protoplasma du grain de raisin peut fabriquer de l'acide droit sans faire en même temps de l'acide gauche.

Mais cette même dissymétrie peut lui permettre, s'il a fabriqué les deux, de n'en consommer qu'un, et de se comporter alors comme les mucédinées et les bactéries que nous avons étudiées plus haut. Les faits connus ne sont donc pas en contradiction avec l'hypothèse qui accepterait la formation simultanée de l'acide droit et de l'acide gauche, avec destruction de l'un des deux seulement. Cette hypothèse est en outre d'accord avec l'existence, dans tous les raisins, d'un peu d'acide gauche, en quantités trop faibles pour qu'on puisse le déceler facilement, mais qui apparaît dans les usines de production d'acide tartrique. Autrefois, dans ces usines, c'étaient les mêmes eaux mères qui rentraient presque indéfiniment dans la fabrication, et qui, après un long usage, contenaient assez d'acide paratartrique pour que celui-ci ait pu, à un certain moment, cristalliser en même temps que l'acide tartrique. Si l'acide racémique est devenu plus rare, ce n'est pas probablement que les raisins n'en fabriquent plus, c'est que les procédés de fabrication ont changé, et que les eaux mères sont renouvelées plus fréquemment.

Il serait assez intéressant de suivre ce point de vue, non pas sur le raisin ou les fruits acides, où les sels de rotation inverse, tartrates, malates, etc., sont difficiles à séparer, mais sur les fruits sucrés ou les racines comme celles de la betterave. Ici le sucre cristallisable est nettement produit comme aliment de réserve dans la première année de végétation. La cellule qui l'a créé le consomme l'année suivante, après l'avoir interverti. Je ne sais pas si on a suivi d'assez près cette disparition du sucre, sur des betteraves assez bien soustraites à l'action des microbes, pour savoir si les deux sucres provenant de l'interversion sont consommés en quantité égale ou inégale. Cela aurait pourtant une grande importance et pourrait mettre sur la voie de ce qui se passe dans le grain de raisin, où nous voyons l'acide tartrique ou, en général, l'ensemble des acides fixes, augmenter, puis décroître, et où il y a, en quelque sorte, deux périodes dans la maturation; l'une, dans laquelle l'acide augmente; l'autre, dans laquelle il disparaît, comme le sucre dans la racine de betterave. Si le protoplasma consomme l'acide gauche de préférence à l'acide droit, c'est à la fin de la première période qu'il faudrait, de préférence, chercher l'acide paratartrique, et si on le rencontre si rarement, c'est peut-être parce qu'on n'opère jamais que sur le raisin après vendange, c'est-à-dire en état de maturation assez avancée pour fournir du bon vin.

Tout ceci nous montre combien se complique, lorsqu'on l'examine de près, la signification du mot aliment. Les corps de nature différente ne sont pas comparables entre eux. Entre les acides et le sucre du raisin, le *botrytis cinerea*, d'après Muller-Thurgau¹, choisit d'abord les acides, puis le sucre, et c'est peut-être là la cause du rôle qu'il joue dans la fabrication de certains vins. Le *penicillium glaucum* fait presque l'inverse; allez donc parler après cela de la valeur alimentaire comparée des sucres et des acides organiques! Entre deux sucres de même constitution, la levure fait un choix. Peré² a vu que son *bacterium coli* attaque très bien l'acide lactique droit, et refuse de vivre sur de l'acide lactique gauche. La levure ordinaire ne veut pas du sucre de lait, qui est consommé si aisément et si complètement par les mucépidées et par les tissus des jeunes

1. *Landwirth. Jahrbücher*, 1888, t. XII.

2. Ces *Annales*, 1893, p. 745.

mammifères. Qu'est-ce donc que la valeur alimentaire d'un sucre, lorsqu'on fait abstraction de l'espèce à qui on le présente? Fischer nous montre que, dans la famille des sucres, les levures ordinaires n'acceptent que les trioses, les hexoses et les nonosides, c'est-à-dire ceux qui contiennent 3, 6 ou 9 molécules de carbone dans leur chaîne organique, et refusent ceux qui en contiennent 5, 7 ou 8. Pourtant ces derniers sucres peuvent devenir la proie de bactéries, car aucun ne saurait échapper à la destruction. Mais on voit combien les voies sont variées; chaque espèce vivante est semblable à un crible qui laisse passer certaines substances et en retient d'autres. Ce qui a échappé au premier n'échappe pas au second, et tout finit par être retenu. Mais pour savoir si une substance entre ou non dans l'alimentation, il faut, comme on voit, non seulement savoir la dimension et la forme de ses éléments, mais encore savoir quelle est la forme et la dimension des trous du crible. C'est cette notion du crible qu'on supprime trop souvent en théorie, au mépris de ce qu'enseigne l'expérience.

DUCLAUX.

INSTITUT PASTEUR

Personne prise de rage au cours des inoculations.

BLUTEL (ISIDORE), 27 ans, cultivateur à Saint-Georges-d'Ambergny (Orne), mordu le 22 avril, traité à l'Institut Pasteur, du 28 avril au 12 mai. Les morsures siégeaient à l'index droit. Le chien mordeur avait été déclaré enragé après autopsie par M. Chapon, vétérinaire à La Ferté.

Dès le 8 mai, Blutel se plaignit d'un malaise général avec courbature, le 11 il avait déjà de la difficulté à avaler. Le 12 il présente de l'aérophobie : son traitement étant terminé, il persiste, malgré nos instances, à vouloir rentrer dans sa famille : il meurt de la rage le 14.

Personne morte de la rage après traitement.

KILLY (JAMES), 6 ans, de Belfast, Irlande. Mordu le 18 avril, traité à l'Institut Pasteur du 23 avril au 7 mai. Les morsures, au nombre de 6, siégeaient sur la périphérie de la jambe droite.

Le chien mordeur a été déclaré enragé après autopsie par Mr. Ross, vétérinaire à Belfast.

Le jeune Killy est mort de la rage le 25 juin.

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE

AVRIL, MAI ET JUIN 1895

	A	B	C
Morsures à la tête { simples	» 4	8	» 2
et à la figure } multiples	» 1	16	» 4
Cautérisations efficaces	» »	» »	» »
— inefficaces	4	9	6
Pas de cautérisation	4	15	» »
Morsures aux mains { simples	» 14	74	» 37
} multiples	14	62	24
Cautérisations efficaces	» »	4	» »
— inefficaces	2	63	29
Pas de cautérisation	26	72	32
Morsures aux membres et au tronc { simples	» 6	27	» 25
} multiples	7	35	33
Cautérisations efficaces	» »	4	» »
— inefficaces	7	37	36
Pas de cautérisation	6	24	22
Habits déchirés	11	14	60
Morsures à nu	2	48	8
Morsures multiples en divers points du corps	» 2	» 5	» 1
Cautérisations efficaces	» »	» »	» »
— inefficaces	4	4	» »
Pas de cautérisation	4	4	1
Habits déchirés	1	» »	» »
Morsures à nu	1	5	1
<hr/>			
Totaux. } Français et Algériens	46	172	115
Etrangers	2	227	11
	A	B	C
TOTAL GÉNÉRAL			
		401	

Les animaux mordeurs ont été : chats, 4 fois ; chiens, 394 fois. — Deux personnes ont eu des écorchures aux mains souillées par la bave de malades atteints de la rage auxquels elles donnaient des soins. Une troisième s'est inoculée de la même façon en soignant une vache enragée.

Le Gérant : G. MASSON.